

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**

Edilane Cristina do Nascimento

**Isolamento, caracterização e avaliação da atividade de bacteriófagos líticos
para biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* em leite cru**

Juiz de Fora
2020

Edilane Cristina do Nascimento

Isolamento, caracterização e avaliação da atividade de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* em leite cru

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Dr. Humberto Moreira Húngaro

Co-orientadora: Dra. Carla Christine Lange

Juiz de Fora
2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento, Edilane Cristina do.

Isolamento, caracterização e avaliação da atividade de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* em leite cru / Edilane Cristina do Nascimento. -- 2020.

72 p.

Orientador: Humberto Moreira Húngaro

Coorientadora: Carla Christine Lange

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2020

1. Bacteriófagos. 2. Psicotróficos. 3. Leite. 4. Proteólise. I. Húngaro, Humberto Moreira , orient. II. Lange, Carla Christine , coorient. III. Título.

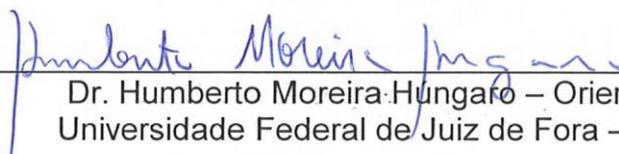
Edilane Cristina do Nascimento

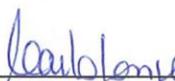
Isolamento, caracterização e avaliação da atividade de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* em leite cru

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Humberto Moreira Hungaro – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF


Dra. Carla Christine Lange – Co-orientadora
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa


Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG


Dr. João Batista Ribeiro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

AGRADECIMENTOS

À Deus por essa conquista e por ter me dado força para superar as adversidades.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), processo APQ CAG 00390/15, pelo apoio financeiro.

Aos bancos de culturas da Universidade Federal de Viçosa e da Fiocruz pela doação dos microrganismos.

Ao professor Humberto Moreira Húngaro pela orientação, oportunidade, confiança e compartilhamento de conhecimento.

À professora Carla Christine Lange pela co-orientação, disponibilidade e compartilhamento de conhecimento.

Aos pesquisadores Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e João Batista Ribeiro pela participação na banca examinadora e contribuição para o enriquecimento desse trabalho.

À todos os funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA) que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica e treinamento profissional Renata, Ana, Mariana, Gilmar, Melissa, Laura, Lucas e Larissa pela colaboração na realização desse trabalho.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O controle do crescimento de bactérias psicotróficas no leite cru é crucial para a manutenção da sua qualidade e de seus derivados. *Pseudomonas fluorescens* destaca-se como principal contaminante, com capacidade de produzir enzimas hidrolíticas termoestáveis. Bacteriófagos, vírus que infectam exclusivamente bactérias, tem sido uma alternativa promissora de biocontrole em alimentos. Contudo, sua eficácia no controle da microbiota deteriorante de leite cru ainda é pouco estudada. Os objetivos desse estudo foram isolar e caracterizar bacteriófagos líticos e avaliar seu efeito sobre a contagem bacteriana, atividade proteolítica e proteólise causada por *P. fluorescens*. Foram utilizadas amostras de água de córregos, rio e efluente de laticínios e o método de enriquecimento para isolamento dos bacteriófagos contra *P. fluorescens*. Foram isolados dezoito bacteriófagos, dos quais sete foram selecionados para caracterização preliminar. A titulação desses bacteriófagos variou de 7 a 9 Log UFP/mL e o tamanho das placas de lise de 0,39 a 2,67 mm. Os isolados apresentaram capacidade de infecção restrita ao gênero *Pseudomonas*. Dois desses bacteriófagos (Ph6 e Ph32) foram caracterizados mais amplamente. Ph6 e Ph32 apresentaram tamanhos de genoma de 38,8 e 31,3 kbp; período de latência de 96 e 25 min; e *burst size* de 295 e 40 partículas virais por célula bacteriana infectada, respectivamente. Nenhum dos dois bacteriófagos foi termicamente inativado após 30 min de tratamento a 63 e 72 °C, e mantiveram suas titulações estáveis após exposição em faixas de pH de 5 – 11 por 60 min. Ambos os bacteriófagos foram inativados após tratamento com hipoclorito de sódio a 200 mg/L durante 30 min. Os bacteriófagos Ph6 e Ph32 reduziram a contagem de *P. fluorescens* em meio de cultivo à base de leite a 4 e 10 °C durante os 7 dias de armazenamento. Além disso, atrasaram em dois dias a atividade proteolítica e proteólise causada por *P. fluorescens*. No leite cru eles reduziram as contagens de *Pseudomonas* spp., psicotróficos e aeróbios mesófilos em 3,2; 2,5 e 2,9 Log UFC/mL, respectivamente, após 7 dias de armazenamento a 4 °C. Os bacteriófagos do presente estudo possuem potencial para aplicação como agentes de controle biológico para preservação do leite cru refrigerado.

Palavras-chave: Psicotróficos. Proteólise. Vírus.

ABSTRACT

The control of psychrotrophic growth in raw milk is crucial for maintaining its quality and its derivatives. *Pseudomonas fluorescens* stands out as the main contaminant, capable of producing thermoestable hydrolytic enzymes. Bacteriophages, viruses that exclusively infect bacteria, have been a promising alternative for biocontrol in food. However, its effectiveness in controlling the raw milk microbiota is still poorly studied. The objectives of this study were to isolate and characterize lytic bacteriophages, as well as to evaluate its effect on the bacterial count, proteolytic activity and proteolysis caused by *P. fluorescens*. Samples of water from streams, rivers and dairy effluents were used, as well as the enrichment method for isolating bacteriophages against *P. fluorescens*. Eighteen bacteriophages were isolated, of which seven were selected for preliminary characterization. The titration of these bacteriophages varied from 7 to 9 Log PFU/mL and the size of the lysis plates was 0.39 and 2.67 mm. They also showed infection capacity restricted to genus *Pseudomonas*. Two of these bacteriophages (Ph6 and Ph32) were more widely characterized. Ph6 and Ph32 showed genome sizes of 38.8 and 31.3 kb; latency period of 96 and 25 min; and burst size of 295 and 40 viral particles per infected bacterial cell, respectively. Neither bacteriophage was thermally inactivated after 30 min of treatment at 63 and 72 ° C, and maintained their titrations stable after exposure in pH ranges of 5 - 11 for 60 min. Both bacteriophages were inactivated after treatment with sodium hypochlorite at 200 mg/L for 30 min. The bacteriophages Ph6 and Ph32 reduced the count of *P. fluorescens* in a milk-based culture medium at 4 and 10 ° C during the 7 days of storage. Also, they delayed proteolytic activity and proteolysis by two days. In raw milk, they decreased the counts of *Pseudomonas* spp., psychrotrophic and aerobic mesophiles by 3.2, 2.5 and 2.9 Log CFU/mL, respectively, after 7 days of storage at 4 °C. The bacteriophages of the present study have potential for application as biological control agents for preserving raw milk.

Keywords: Psychrotrophic. Proteolysis. Virus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	OBJETIVO	10
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2.2	HIPÓTESE.....	10
3	REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1	PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE E ASPECTOS NORMATIVOS.....	11
3.2	QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU.....	14
3.2.1	Microrganismos psicrotróficos	16
3.2.1.1	<i>Pseudomonas spp.</i>	17
3.2.1.2	<i>Enzimas hidrolíticas</i>	19
3.2.1.2.1	Proteases.....	20
3.2.1.2.2	Lipases.....	21
3.3	MEDIDAS PARA CONTROLE DE PSICOTRÓFICOS.....	23
3.3.1	Bacteriófagos	24
3.4	BACTERIÓFAGOS E LÁCTEOS.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MICRORGANISMOS.....	32
4.2	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS.....	33
4.3	DETERMINAÇÃO DA TITULAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS.....	34
4.4	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PLACAS DE LISE DOS BACTERIÓFAGOS.....	35
4.5	AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS BACTERIÓFAGOS.....	35
4.6	PROPAGAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS.....	35
4.7	DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DOS BACTERIÓFAGOS (<i>One-step Growth</i>).....	36
4.8	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DO GENOMA DOS BACTERIÓFAGOS.....	37
4.9	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS BACTERIÓFAGOS	38

4.10	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS BACTERÍOFAGOS A SANITIZANTE.....	38
4.11	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS BACTERÍOFAGOS A DIFERENTES FAIXAS DE pH.....	39
4.12	EFEITO DOS BACTERÍOFAGOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>P. fluorescens</i>	39
4.13	EFEITO DE BACTERÍOFAGOS SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE <i>P. fluorescens</i>	40
4.14	EFEITO DE BACTERÍOFAGOS SOBRE PROTEÓLISE CAUSADA POR <i>P. fluorescens</i>	40
4.15	EFEITO DOS BACTERÍOFAGOS SOBRE A CONTAGEM DE <i>Pseudomonas</i> spp., PSICROTRÓFICOS E MESÓFILOS EM LEITE CRU.....	41
4.16	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	ISOLAMENTO DOS BACTERÍOFAGOS.....	43
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS.....	44
5.2.1	Titulação, tamanho das placas de lise e especificidade	45
5.2.2	<i>One-step growth</i>, tamanho de genoma, resistência ao tratamento térmico, ao sanitizante e pH	48
5.3	EFEITO DA ADIÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS SOBRE A CONTAGEM BACTERIANA, ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E PROTEÓLISE CAUSADA POR <i>P. fluorescens</i>	53
5.4	CONTROLE DE <i>Pseudomonas</i> spp., PSICROTRÓFICOS E MESÓFILOS EM LEITE CRU.....	59
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é um dos setores econômicos mais importantes do Brasil, e representa aproximadamente 25% do PIB (Produto Interno Bruto). Em 2018, o Brasil foi classificado como o sexto maior produtor de leite do mundo e a atividade leiteira cresce mais que o dobro do PIB brasileiro, ano após ano, há quase duas décadas (IBGE, 2016; IBGE, 2018; ROCHA & CARVALHO, 2018). Apesar da importância econômica da produção leiteira para o país, o Brasil não atende a demanda de leite do mercado interno e a exportação é pouco expressiva, fato relacionado com a falta de investimento na tecnificação da produção e na melhoria da qualidade do leite produzido (VILELA *et al.*, 2017).

Em 1952 iniciou-se no Brasil a publicação de legislações a fim de regulamentar a produção leiteira, assim como estabelecer parâmetros de qualidade para o leite. Todavia, em função da dificuldade de atendimento dentro dos prazos aos parâmetros estabelecidos, várias normas foram sendo publicadas ao longo dos anos com extensão dos prazos para o cumprimento. As atuais normas que estabelecem a identidade e qualidade do leite e os critérios e procedimentos para produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru são as Instruções Normativas 76 e 77 publicadas em 26 de novembro de 2018 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essas normativas estabelecem que o leite cru deve ser mantido a uma temperatura máxima de conservação de 4 °C na propriedade rural, nos postos de refrigeração e no estabelecimento industrial e que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento na unidade de beneficiamento não deve ser superior a 48 horas (BRASIL, 2018b; BRASIL, 2018c).

O acondicionamento do leite a 4 °C é uma medida importante para a manutenção da sua qualidade, pois controla a proliferação das bactérias mesófilas, as quais se multiplicam em temperaturas na faixa de 20 a 40 °C. Altas contagens bacterianas no leite cru levam à degradação dos seus constituintes e à perda da qualidade e do rendimento dos derivados lácteos. Vários estudos demonstram que, em geral, a contaminação microbiana do leite cru produzido no Brasil é alta (BRASIL *et al.*, 2012; HENRICHES *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2006; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018) e não atende às exigências legais vigentes.

Além da alta contagem total de bactérias, outro problema que ocorre no leite brasileiro são as altas taxas de contaminação por psicotróficos (ARCURI *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2006; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018). As bactérias psicotróficas são capazes de se multiplicar em temperaturas de 0 a 7 °C e compreendem vários gêneros bacterianos, dentre os quais *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Serratia* e *Lactococcus* apresentam maior importância para a indústria de laticínios. *Pseudomonas* é o gênero de maior prevalência em leite cru refrigerado e a principal causa de deterioração dessa matéria-prima e seus derivados (MACHADO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2015; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018; VITHANAGE *et al.*, 2016). Este gênero caracteriza-se por bactérias Gram negativas, aeróbias, não formadora de esporos, termolábeis, ubiqüitárias e muitas de suas espécies são produtoras de enzimas extracelulares, especificamente proteases e lipases, termoestáveis. *P. fluorescens* é a principal espécie de microrganismo psicotrófico encontrado no leite cru em vários estudos (MACHADO *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2015; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018; VITHANAGE *et al.*, 2016).

Os principais mecanismos empregados para controlar a contaminação por psicotróficos são as medidas higiênico-sanitárias durante a ordenha do leite e na higienização dos equipamentos, todavia, sozinhas não são suficientes para solucionar o problema da contaminação (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Vários estudos têm sido conduzidos em busca de alternativas (MUNSCH-ALATOSSAVA *et al.*, 2018; SITOHY *et al.*, 2011; VIANNA *et al.*, 2012), dentre as quais pode ser citada a utilização de bacteriófagos líticos (HU, MENG & LIU, 2016; TANAKA *et al.*, 2018). Os bacteriófagos líticos são vírus com a capacidade específica de infectar bactérias e causar a sua inativação, sendo inofensivos para os seres humanos e uma medida natural para o controle da contaminação do leite cru refrigerado por microrganismos psicotróficos (HU, MENG & LIU, 2016; SILLANKORVA *et al.*, 2012). Todavia o reduzido número de trabalhos publicados para avaliar sua eficácia no controle de microrganismos deteriorantes de lácteos torna necessária pesquisas nessa área.

Portanto pesquisas para uso dos bacteriófagos como agentes naturais de biocontrole no leite cru refrigerado são fundamentais para ampliar o conhecimento da eficácia desses agentes sobre o hospedeiro, a inocuidade para as culturas lácticas e seus efeitos sobre a atividade enzimática dos psicotróficos e proteólise do leite cru.

2 OBJETIVO

Isolar e caracterizar bacteriófagos líticos, bem como, avaliar seu efeito sobre a contagem bacteriana, atividade proteolítica e proteólise causada por *P. fluorescens*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Isolar bacteriófagos líticos para *P. fluorescens* deteriorantes de leite cru;
- 2) Caracterizar bacteriófagos líticos para *P. fluorescens* quanto à titulação, tamanho de placas de lise, especificidade de microrganismos alvos, características de crescimento, tamanho do genoma, resistência térmica, a sanitizante e a diferentes faixas de pH;
- 3) Avaliar o efeito de bacteriófagos sobre a contagem bacteriana, atividade proteolítica e proteólise causada por *P. fluorescens* em meio de cultivo líquido à base de leite;
- 4) Avaliar a influência da adição de bacteriófagos nas contagens de *Pseudomonas* spp., psicrotróficos e mesófilos em leite cru.

2.3 HIPÓTESE

Adição de bacteriófagos ao leite cru refrigerado reduz o crescimento de *P. fluorescens* e a degradação dos constituintes proteicos do leite.

3 REVISÃO DE LITERATURA

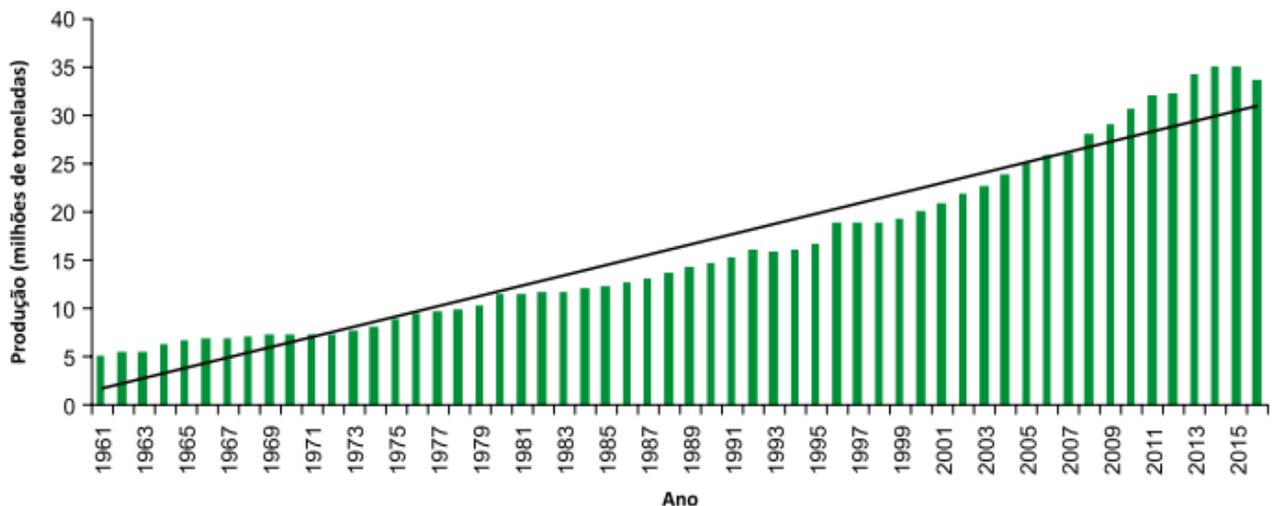
Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção mundial de leite em 2016 foi 817 milhões de toneladas, sendo a União Europeia a região com a maior produção do mundo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017). O Brasil, em 2018, foi classificado pela USDA (*United States Department of Agriculture*) como o sexto maior produtor de leite do mundo (IBGE, 2018).

3.1 PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE E ASPECTOS NORMATIVOS

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção mundial de leite em 2016 foi 817 milhões de toneladas, sendo a União Europeia a região com a maior produção do mundo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017). O Brasil, em 2018, foi classificado pela USDA (*United States Department of Agriculture*) como o sexto maior produtor de leite do mundo (IBGE, 2018).

O primeiro registro da produção de leite brasileiro data de 1961 pela FAO, com 5,2 milhões de toneladas. Ao longo dos anos a produção cresceu sistematicamente, observando-se um aumento médio anual de 555 mil toneladas até o ano de 2015 (VILELA *et al.*, 2017) (Figura 1).

Figura 1 – Produção de leite brasileira de 1961 a 2015.



Fonte: Adaptado de IBGE, 2016.

A produção brasileira de leite, em 2016, foi de 33,6 bilhões de litros (IBGE, 2016) e em 2017, foi de 33,5 bilhões, apresentando uma retração de 0,5% em relação ao ano de 2016 (IBGE, 2017). Já em 2018 a produção foi de 33,8 bilhões de litros, com aumento na produção de 1,6% em relação ao ano anterior. As regiões Sul e Sudeste são as maiores produtoras representando 34,2% e 33,9% do total de litros de leite produzidos, respectivamente, e a região Sul deteve a maior produtividade com média de 3.437 litros/vaca/ano em 2018 (IBGE, 2018). Apesar de ser um dos maiores produtores mundiais de leite e da importância econômica desta atividade para o Brasil, o país não atende à demanda de leite do mercado interno e a exportação é pouco expressiva. Um dos entraves para a expansão da produtividade e dos mercados inclui a falta de investimento em tecnificação da produção e melhoria da qualidade do leite produzido (VILELA *et al.*, 2017).

O primeiro ato de organização e regulamentação da produção leiteira no país deu-se pelo Decreto 30.691 de 29 de março de 1952, o qual dispunha sobre a Regulamentação da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) destinados ao comércio interestadual ou internacional. Este decreto deu início à busca pela melhoria da qualidade do leite produzido no país e foi modificado várias vezes ao longo dos anos tendo em vista a necessidade de atualização para aumentar a competitividade do setor (MAIA *et al.*, 2014).

Em 2002 foi publicada a Instrução Normativa n° 51 pelo MAPA aprovando os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, fixando os requisitos mínimos a serem atendidos pelos produtores e indústrias no que tange a produção, identidade e qualidade para cada categoria de leite (BRASIL, 2002).

A partir da instituição da IN 51 foram abolidos o armazenamento e o transporte do leite cru em temperatura ambiente, determinando-se a instalação de tanques de refrigeração nas propriedades e o transporte do leite em caminhões com tanques isotérmicos. Nos tanques de refrigeração por expansão se estabeleceu a refrigeração do leite à temperatura de 4 °C ou menos e para os tanques de imersão 7 °C ou menos, em até três horas após a ordenha. Para o transporte do leite estabeleceu-se que o tempo entre ordenha e a recepção no estabelecimento de beneficiamento não fosse superior a 48h (BRASIL, 2002). O estabelecimento da

refrigeração do leite cru foi importante para a conservação de sua qualidade microbiológica, pois limita o crescimento de microrganismos mesófilos que causam sua deterioração e prejuízos no processamento (SAMARŽIJA *et al.*, 2012).

A IN 51 também instituiu parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e de contagem de células somáticas (CCS) para o leite cru refrigerado, com prazos específicos a serem cumpridos por cada região brasileira. Para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste estipulou-se o prazo de adequação até julho de 2005 e para as regiões Norte e Nordeste, até julho de 2007, para atingir o limite máximo de $1,0 \times 10^6$ para a contagem padrão em placas (CPP) expressa em UFC/mL e para a contagem de células somáticas (CCS) expressa em CS/mL, com reduções progressivas desses valores até 2011. A partir de julho de 2011 determinou-se o valor máximo de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL e $4,0 \times 10^5$ CS/mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste e para as regiões Norte e Nordeste, até julho de 2012 (BRASIL, 2002). Todavia, em virtude da dificuldade de adequação dos produtores à normativa, esta foi substituída pela Instrução Normativa n° 62, publicada em dezembro de 2011 (BRASIL, 2011).

A IN 62 aboliu os leites tipo B e C e definiu as temperaturas máximas de conservação do leite cru como sendo de 4 °C para tanques de refrigeração por expansão e de 7 °C para os tanques de imersão e de 10°C para estabelecimentos processadores. Ela também estendeu os prazos para o cumprimento dos critérios microbiológicos e de CCS do leite cru refrigerado, estabelecendo para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste o prazo de dezembro de 2011 e para as regiões Norte e Nordeste, até dezembro de 2012, o valor máximo para CPP de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL e para CCS de $7,5 \times 10^5$ CS/mL. Reduções progressivas foram determinadas, atingindo os valores de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL e de $4,0 \times 10^5$ CS/mL até 2016 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste e 2017 para Norte e Nordeste (BRASIL, 2011). Entretanto, os requisitos não foram atendidos dentro dos prazos estipulados na IN 62, sendo publicada uma nova instrução normativa em 2016 com extensão dos prazos de adequação, a Instrução Normativa n° 07 de 03 de maio de 2016 (BRASIL, 2016).

A IN 07 ampliou os prazos para os produtores atingirem os valores máximos de CPP e CCS de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL e de $4,0 \times 10^5$ CS/mL, respectivamente, até julho de 2018 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste e até julho de 2019 para as regiões Norte e Nordeste. Contudo, em 2018 foi publicada pelo MAPA a Instrução

Normativa nº 31, alterando novamente os prazos para o cumprimento dos critérios microbiológicos e de CCS para o leite cru refrigerado, estendendo até julho de 2019 para todas as regiões do país (BRASIL, 2016; BRASIL, 2018a). Porém, ainda em 2018 foram publicadas novas instruções normativas, a IN 76 e a IN 77 de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018b, BRASIL, 2018c), que revogaram a IN 62 e a IN 31, entrando em vigor seis meses após sua data de publicação.

A Instrução Normativa nº 76 aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de leite cru refrigerado, de leite pasteurizado e de leite pasteurizado tipo A e a Instrução Normativa nº 77 estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. As mudanças trazidas por essas instruções em relação às anteriores incluem alterações nas temperaturas de conservação e nos critérios de qualidade microbiológica e CCS do leite. A temperatura de conservação do leite cru refrigerado nas propriedades rurais, nas unidades de beneficiamento e em postos de refrigeração restringiu-se ao máximo de 4 °C. A temperatura máxima do leite no recebimento foi fixada em 7 °C, sendo que excepcionalmente o leite possa ser recebido com temperatura de até 9 °C. Os critérios microbiológicos e de CCS definidos para tanques individuais ou comunitários foram de médias geométricas trimestrais de CPP de no máximo $3,0 \times 10^5$ UFC/mL e de CSS de no máximo $5,0 \times 10^5$ CS/mL, sendo que antes de seu processamento não deva apresentar CPP maior que $9,0 \times 10^5$ UFC/mL (BRASIL, 2018b, BRASIL, 2018c).

3.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE DO CRU

Segundo a Instrução Normativa 76 do MAPA o leite cru refrigerado é definido como o leite produzido em propriedades rurais, refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados sob serviço de inspeção oficial. Ela estabelece que o leite cru deve ser mantido em temperatura constante de 4 °C nas propriedades rurais, unidades de beneficiamento e em postos de refrigeração (BRASIL, 2018b). O acondicionamento do leite a 4 °C é uma medida importante para a manutenção da sua qualidade microbiológica, pois controla a proliferação das bactérias mesófilas, as quais se multiplicam em temperaturas na faixa de 20 a 40 °C.

A qualidade microbiológica do leite cru pode ser determinada por contagem padrão em placas, que é um indicador das condições higiênico-sanitárias da ordenha (BRASIL *et al.*, 2012; HENRICHS *et al.*, 2014).

O limite de CPP previstos na IN 76 é de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL (BRASIL, 2018b). Altos valores de CPP no leite resultam em prejuízos para produtores e para a indústria, pois quanto maior o número de microrganismos presentes no leite maior será a degradação dos constituintes dessa matéria-prima. A degradação desses constituintes do leite leva à redução do rendimento industrial e alterações nos produtos finais (BRASIL *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2017). Em geral, a contaminação microbiana do leite cru produzido no Brasil é alta se comparado a outros países e varia de região para região. Vários estudos demonstram que o leite produzido no país não atende às exigências legais vigentes (PINTO *et al.*, 2006; HENRICHS *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2015; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018).

No estudo feito por Henrichs *et al.* (2014), realizado na região metropolitana do Paraná, o valor médio encontrado para CPP foi de $9,8 \times 10^5$ UFC/mL, estando acima dos limites estabelecidos pela IN 76, que é de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. Menezes *et al.* (2015) em seu estudo da qualidade microbiológica do leite cru produzido na região Norte de Minas Gerais, encontraram uma média para mesófilos de $4,49 \times 10^7$ UFC/mL e para psicrotróficos, de $1,61 \times 10^7$ UFC/mL. Ribeiro Júnior *et al.* (2018) encontraram para contagens de psicrotróficos uma média de $1,1 \times 10^4$ UFC/mL. Os valores encontrados para mesófilos nesses estudos encontram-se acima do estabelecido pela legislação, além disso, foram verificadas também altas contagens de psicrotróficos. A legislação brasileira para leite cru não estabelece limites para a contagem de psicrotróficos, todavia contagens desse grupo microbiano igual ou superior a 10^6 UFC/mL trazem prejuízos para produção de derivados lácteos e a deterioração do leite já se torna perceptível (MACHADO *et al.*, 2017; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018).

No estudo feito por Henrichs *et al.* (2014) foi observada a correlação positiva entre o aumento da CPP e a redução dos constituintes do leite, como a lactose e as proteínas, indicando que esta redução deve-se à utilização desses substratos pelos microrganismos. As contagens médias de CPP acima dos limites legais são indicativas de falhas de manuseio relacionadas às medidas higiênico-sanitárias, falta de cuidados com a sanidade do rebanho e com a qualidade da água utilizada, além

de tempo prolongado de estocagem do leite e variações na temperatura até o seu transporte à unidade de beneficiamento (SANTOS & FONSECA, 2007).

A manutenção do leite cru por longos períodos de tempo refrigerado, nas propriedades rurais ou na unidade de beneficiamento, compromete a qualidade da matéria-prima. O armazenamento prolongado possibilita a seleção de microrganismos psicotróficos, os quais crescem nas temperaturas de refrigeração do leite. Esses microrganismos, em sua maioria, possuem ação proteolítica e lipolítica, que irão levar a inúmeros prejuízos à cadeia produtiva do leite e derivados (BRASIL *et al.*, 2012; HENRICHS *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2015).

3.2.1 Microrganismos psicotróficos

O termo psicotrófico aplica-se aos microrganismos capazes de crescer sob temperaturas de 0 a 7 °C, ou seja, capazes de se desenvolverem em temperaturas de refrigeração, independente da sua temperatura ótima de crescimento (JAY, 2005). Uma das características dos microrganismos psicotróficos, que permite sua adaptação às temperaturas de refrigeração, é a síntese de fosfolipídios e lipídios da membrana plasmática (MP) com maiores proporções de ácidos graxos insaturados em relação às proporções encontradas na MP de microrganismos não psicotróficos. Este fenômeno possibilita a manutenção da fluidez da MP, mantendo suas funções de transporte e secreção, uma vez que os ácidos graxos insaturados possuem menor ponto de fusão que os ácidos graxos saturados, permanecendo líquidos nas temperaturas de refrigeração (JAY, 2005; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018).

A refrigeração e armazenagem frigorífica do leite cru visam à prevenção da acidificação do leite causada pelo crescimento de bactérias mesófilas. No entanto, o tempo de armazenamento prolongado do leite cru a baixas temperaturas permite que ocorra a substituição das bactérias aeróbias mesófilas Gram-positivas, inicialmente dominantes, pelos microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos psicotróficos (SAMARŽIJA *et al.*, 2012). Esses microrganismos encontram-se amplamente distribuídos entre os gêneros de bactérias Gram-negativas e em menor proporção entre as Gram-positivas (JAY, 2005; MACHADO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2015). Apesar de os psicotróficos reduzirem o metabolismo em baixas

temperaturas eles apresentam boa atividade enzimática, podendo apresentar inclusive maior síntese de enzimas quando crescem em temperaturas de refrigeração em comparação com o crescimento em temperaturas mais elevadas, próximas à temperatura ótima de crescimento (JAY, 2005).

Os microrganismos psicotróficos estão comumente presentes no leite cru refrigerado e, pelo fato de produzirem enzimas, proteases e lipases, comprometem a qualidade do leite e de produtos lácteos. A atuação das enzimas é mantida inclusive durante o processamento e período de armazenamento dos derivados, pois são termoestáveis, permanecendo ativas após os tratamentos térmicos aplicados ao leite pela indústria. A ação prolongada de proteases e lipases pode causar diminuição do rendimento de queijos, alterações sensoriais no leite fluido ou produtos lácteos tais como sabor amargo ou rançoso, e gelificação e sedimentação no leite UHT (*Ultra High Temperature*) (MACHADO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2014; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018).

As bactérias Gram-positivas psicotróficas isoladas a partir de leite cru incluem os seguintes gêneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus*. Dentre os microrganismos Gram-negativos têm-se *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* e *Flavobacterium*. As estirpes mais frequentemente isoladas pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*, com predominância do gênero *Pseudomonas* (ARCURI *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2015; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018; SAMARŽIJA *et al.*, 2012; VITHANAGE *et al.*, 2016).

3.2.1.1 *Pseudomonas* spp.

O gênero *Pseudomonas* pertence à ordem *Pseudomonadales* e à família *Pseudomonadaceae*. É caracterizado por bactérias Gram-negativas, aeróbias e comumente flageladas, apresentando flagelos polares e em alguns casos subpolar. A estrutura da membrana externa é assimétrica e composta por lipopolissacarídeo. As células das estirpes de *Pseudomonas* diferem, substancialmente, em seu tamanho e forma, podendo variar de 0,5 a 5,0 μm e serem retas a levemente curvas, respectivamente (PALLERONI, 2005).

É um dos gêneros mais heterogêneos e ecologicamente significativos de bactérias conhecidas devido ao fato de que as suas necessidades nutricionais são muito simples. Representantes deste gênero foram detectados em praticamente todos os habitats naturais (solo, poeira doméstica, água doce e nuvens), e também foram isolados de instrumentos clínicos, soluções assépticas, cosméticos e produtos médicos (OLIVEIRA *et al.*, 2015). As espécies de *Pseudomonas* são os microrganismos contaminantes mais comuns isolados do leite cru refrigerado (ARCURI *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2015; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018; VITHANAGE *et al.*, 2016).

Em estudo feito por Vithanage *et al.* (2016), ao analisar amostras de leite cru refrigerado, foi constatado que o gênero predominante dentre os microrganismos contaminantes foi *Pseudomonas*. Dentro desse gênero, *P. fluorescens* é a espécie considerada como o principal contaminante e agente de deterioração do leite cru refrigerado (ARCURI *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2015). A produção de enzimas hidrolíticas termoestáveis por este gênero é um fator agravante, pois leva à deterioração do leite cru e dos derivados lácteos (FERREIRA *et al.*, 2012; HAHNE *et al.*, 2018; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018).

As espécies *P. fluorescens* UFV 07A e *P. fluorescens* UFV 041, utilizadas neste estudo, foram isoladas por Pinto *et al.* (2006) de amostras provenientes de tanques de refrigeração individual, coletivos e de silos de uma indústria processadora de leite localizada na Zona da Mata Mineira. Em estudos complementares de caracterização dessas estirpes verificou-se seu potencial de produção de proteases (PINTO *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2014).

A capacidade de proteólise das duas estirpes difere, no estudo realizado por Pinto *et al.* (2014) constatou-se que *P. fluorescens* UFV 041 possui maior atividade proteolítica. Foi observada maior concentração de tirosina nas amostras de leite inoculadas com *P. fluorescens* UFV 041 incubadas em diferentes temperaturas ao longo de dez dias. A degradação da caseína nas amostras de leite inoculadas com *P. fluorescens* UFV 041 também ocorreu de forma mais rápida quando comparada com as amostras inoculadas da estirpe de *P. fluorescens* UFV 07A.

P. fluorescens UFV 041 possui a capacidade de sintetizar uma protease (*aprX*) e uma lipase (*lipM*). A massa de ambas as enzimas foi estimada em 49,365 e 49.811 kDa. O gene *aprX* de *P. fluorescens* UFV 041 mostrou 97% de identidade

com a metaloprotease alcalina extracelular (*aprX*) da estirpe A506 de *P. fluorescens*. Já o gene *lipM* mostrou 93% de identidade com a lipase A da poliuretase A (*pulA*) (MARTINS *et al.*, 2015). O gene *g5* codifica a protease sintetizada pela *P. fluorescens* UFV 07A com massa estimada de 49.486 kDa, caracterizada como metaloprotease extracelular (ALVES *et al.*, 2016).

3.2.1.2 Enzimas hidrolíticas

Enzimas hidrolíticas ou hidrolases são proteínas ativas biologicamente que catalizam reações de hidrólise de ligação covalente; e, portanto, podem induzir modificações nos constituintes do leite. Essas enzimas produzidas pelos microrganismos psicotróficos são denominadas enzimas exógenas, podendo ser extracelulares ou intracelulares, ou seja, secretadas para o meio externo ou liberadas após a lise da célula bacteriana, respectivamente (CRUZ *et al.*, 2016).

Em geral, a ação das enzimas hidrolíticas promove a hidrólise da caseína ou da gordura do leite. A degradação das proteínas leva à formação de uma estrutura de gel (coagulação do leite) decorrente da precipitação das proteínas. Já a degradação da gordura leva ao aumento da concentração de ácidos graxos livres de cadeia curta. Esse processo culmina em perda de rendimento, amargor, rancificação, sabores maltados ou metálicos no leite e derivados. Como fator agravante, muitas dessas enzimas são termoestáveis, o que permite a continuidade da sua atividade mesmo depois do leite passar por tratamentos térmicos. Estas moléculas têm a capacidade de manter de 30 a 70% da sua atividade mesmo depois de serem submetidas a tratamentos térmicos convencionalmente utilizados no processamento do leite (CHEN *et al.*, 2003; GLÜCK *et al.*, 2016; MATÉOS *et al.*, 2015; SAMARŽIJA *et al.*, 2012; STOECKEL *et al.*, 2016b).

As enzimas hidrolíticas são produzidas pelos microrganismos durante o armazenamento do leite cru e sua formação começa durante a fase de crescimento exponencial das bactérias e continua durante a fase estacionária, aumentando com o tempo de armazenamento (STOECKEL *et al.*, 2016a). Outro fator importante sobre as enzimas produzidas pelos psicotróficos é que as proteases microbianas podem interagir com as proteases endógenas quando ambas estão presentes no leite. A presença de proteases microbianas no leite cru conduz à liberação de plasmina, a

principal protease endógena, a partir da fração de caseína do leite para a fração do soro de leite, assim como estimulam a ativação de plasminogênio, fator que pode intensificar ainda mais a hidrólise dos componentes do leite e as alterações nos produtos lácteos (SAMARŽIJA *et al.*, 2012; STOECKEL *et al.*, 2016a).

3.2.1.2.1 Proteases

As proteases são enzimas proteolíticas, ou seja, que hidrolisam moléculas proteicas (CRUZ *et al.*, 2016). De acordo com o *Nomenclature Committee of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) as enzimas são classificadas sob os números EC (*Enzyme Commission Numbers*) e recomenda-se o termo peptidase para as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Há dois grupos de peptidasas/proteases produzidas por psicotróficos, as exopeptidasas (EC 3.4.11 e EC 3.4.19), as quais atuam a partir das extremidades das cadeias polipeptídicas, e as endopeptidasas (EC 3.4.21, EC 3.4.24 e EC 3.4.99), que clivam as ligações a partir do interior das cadeias polipeptídicas (BAUR *et al.*, 2015).

Dos pontos de vista de qualidade e econômico, as proteases formadas por *Pseudomonas* spp. têm maior importância para a indústria de laticínios, pois estas bactérias são comumente encontradas como microbiota de leite cru (BAUR *et al.*, 2015; VITHANAGE *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2017; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018). Várias das enzimas hidrolíticas produzidas por *Pseudomonas* spp. são capazes de manter a sua atividade entre 60 - 70% após a pasteurização, e de 30 - 40% após a esterilização do leite (GLÜCK *et al.*, 2016; MATÉOS *et al.*, 2015; SAMARŽIJA *et al.*, 2012). Em estudo realizado por Baglinière *et al.* (2012) foi avaliada a atividade de nove estirpes de *P. fluorescens* sobre a desestabilização do leite UHT. Um grupo de *P. fluorescens* classificado como altamente desestabilizador causou a sedimentação, formação de agregados, redução do potencial Zeta e da camada de hidratação das micelas de caseína. Diferenças na atividade enzimática são observadas entre estirpes de *Pseudomonas*, essas diferenças podem estar relacionadas com a grande variação genética que este gênero apresenta (MARCHAND *et al.*, 2009; SAMARŽIJA *et al.*, 2012).

Entre as proteínas do leite, as frações κ , β e α_1 da caseína são preferencialmente hidrolisadas pelas proteases extracelulares produzidas por *P. fluorescens*, enquanto que a proteólise das proteínas do soro de leite parece ser

limitada. A proteólise preferencial da κ e β -caseína pode estar relacionada com a posição particular dessas frações na micela de caseína e a uma concentração mais alta na fase aquosa em comparação com as outras frações caseínicas (BAGLINIÈRE *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2017).

A atuação das proteases é prejudicial para diversos derivados lácteos. Quando contaminado por psicotróficos e armazenado a baixas temperaturas por longos períodos de tempo, o leite cru sofrerá intensa hidrólise das proteínas. Em lácteos fermentados a proteólise implicará em mudanças de textura e sabor, maior viscosidade e a uma sinérese mais pronunciada. As mudanças associadas à proteólise também favorecem o crescimento das culturas microbianas utilizadas para a fermentação do leite, pois aumenta as concentrações de aminoácidos livres, alterando o produto final (FERREIRA *et al.*, 2012; SAMARŽIJA *et al.*, 2012). No caso do leite UHT, a presença das enzimas hidrolíticas termoestáveis é especialmente prejudicial para a sua qualidade, devido à sua estocagem à temperatura ambiente por longos períodos de tempo, levando à gelificação, sedimentação e alteração de sabor (BAGLINIÈRE *et al.*, 2012; BAGLINIÈRE *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2003; MATÉOS *et al.*, 2015; STOECKEL *et al.*, 2016b).

Para a fabricação de queijos, a ocorrência de bactérias psicotróficas e de suas enzimas tem um impacto negativo sobre a qualidade geral do produto. Como consequências há a desestabilização do sistema de plasmina natural do leite, o que leva a alterações de textura e sabor e alterações do tempo de coagulação do leite pelo coalho, em função da formação de complexos de proteína (SAMARŽIJA *et al.*, 2012; STOECKEL *et al.*, 2016a). Além disso, há redução do rendimento da coalhada em função da proteólise da caseína, que leva à geração e perda de peptídeos no soro de queijo e alterações de sabor em queijos semi-duros e duros durante a maturação, em função da atividade das enzimas hidrolíticas que permaneceram na coalhada (LEITNER *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2016).

3.2.1.2.2 Lipases

Lipases são enzimas que hidrolisam ésteres de triacilgliceróis em ácidos graxos livres (BEVEN *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2016). De acordo com o *Nomenclature Committee of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) as lipases são carboxil-hidrolases (EC 3.1.1.3), possuindo a

capacidade de hidrolisar triacilgliceróis, ácidos graxos de cadeia longa (C>10) (BAUR *et al.*, 2015).

As lipases de bactérias psicotróficas Gram-negativas e Gram-positivas têm uma massa molecular entre 30 e 65 kDa e pH ótimo entre 7 e 9, e apresentam determinadas especificidades no que se refere ao local de clivagem para a hidrólise de triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis (BEVEN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003). Essas enzimas hidrolisam a gordura do leite, assim como a lecitina, dando origem a ácidos graxos livres. O aumento da concentração de ácidos graxos livres de cadeia curta (C4-C8) faz com que seja conferido sabor de ranço aos produtos lácteos. O aumento dos ácidos graxos de cadeia média (C10-C12) é relacionado como a causa mais comum para os sabores de sabão ou amargor, e o aumento de ácidos graxos de cadeia longa (C14-C18) não são correlacionados com influências no sabor do leite e dos produtos lácteos (BAUR *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2003; SAMARŽIJA *et al.*, 2012).

As lipases produzidas pelos microrganismos psicotróficos, além de hidrolisar a gordura do leite, são capazes também de desestruturar a membrana dos glóbulos de gordura permitindo a atuação das lipases endógenas, resultando em uma desestabilização da emulsão (SAMARŽIJA *et al.*, 2012; STOECKEL *et al.*, 2016a). Em condições naturais as lipases endógenas não seriam capazes de degradar a gordura do leite, no entanto, as lipases produzidas pelos microrganismos psicotróficos clivam a membrana dos glóbulos de gordura, permitindo a quebra das moléculas de triacilgliceróis pelas lipases endógenas, intensificando ainda mais a lipólise no leite e derivados (DEETH, 2006).

As alterações nos derivados lácteos em função da ação hidrolítica das lipases são facilmente notadas em produtos como a manteiga e creme de leite pasteurizado. Esses produtos têm seu potencial deteriorante aumentado devido ao fato de possuírem alto teor de gordura em sua composição e pela propensão das lipases microbianas permanecerem na fração gordurosa do leite. Em manteiga, a presença de lipases produzidas por *Pseudomonas* spp. pode provocar a sua rancificação (oxidação lipídica) durante o armazenamento a 5 °C, por 2 dias (MAZIERO *et al.*, 2010). Em queijos as enzimas permanecem adsorvidas sobre os glóbulos, levando a uma lipólise indesejável no final da maturação, com alta concentração de ácidos graxos de cadeia curta, que são responsáveis por causar *off-flavours* nos queijos. *P. fluorescens* e *P. fragi* têm sido relatadas como as principais bactérias associados

com a rancificação de derivados lácteos (BAUR *et al.*, 2015; BEVEN *et al.*, 2001; SAMARŽIJA *et al.*, 2012).

3.3 MEDIDAS PARA CONTROLE DE PSICROTRÓFICOS

As principais medidas empregadas para controlar a contaminação por microrganismos psicotróficos são as medidas higiênico-sanitárias adotadas durante a ordenha do leite e higienização dos equipamentos, assim como medidas que visam à manutenção da sanidade do rebanho. Apesar de reduzirem a carga microbiana inicial no leite cru, apenas o emprego dessas medidas pode não ser suficiente para solucionar o problema da contaminação por psicotróficos, existindo a necessidade de medidas alternativas. O uso de gases, como o dióxido de carbono e o dinitrogênio, uso de substâncias químicas, como o peróxido de hidrogênio e tiocianato de sódio, e a adição de proteínas de leguminosas esterificadas incluem algumas das alternativas estudadas para controlar psicotróficos contaminantes do leite cru (BOULARES *et al.*, 2011; MUNSCH-ALATOSSAVA *et al.*, 2018; SITOHY *et al.*, 2011; VIANNA *et al.*, 2012).

O dióxido de carbono (CO₂) inibe o crescimento microbiano e reduz a produção de enzimas, pois afeta o metabolismo dos microrganismos uma vez que promove a redução do pH permitindo a manutenção da qualidade do leite durante a estocagem (MUNSCH-ALATOSSAVA *et al.*, 2018; VIANNA *et al.*, 2012). Vianna *et al.* (2012), avaliaram o efeito da adição do CO₂ ao leite cru estocado, por seis dias, a 4 °C. Posteriormente, eles analisaram o leite quanto a sua composição físico-química, contagem total de bactérias, de psicotróficos e *Pseudomonas* spp. e verificaram a manutenção das características iniciais de qualidade físico-química e microbiológica no leite tratado com CO₂.

Outro gás que pode ser utilizado é o dinitrogênio (N₂) no leite cru, o qual também visa à redução do crescimento bacteriano durante a sua estocagem. Munsch-Alatossava *et al.* (2018) avaliaram o efeito do N₂ sobre a qualidade microbiológica do leite cru estocado por 7 dias, a 6 °C. No sétimo dia de estocagem o leite tratado com N₂ apresentou contagem total de bactérias com 4 ciclos logaritmos a menos do que o leite não tratado, assim como menor produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas.

A ativação do sistema lactoperoxidase (LP) do leite é outra possibilidade para a manutenção da qualidade microbiológica do leite cru e inibição do crescimento dos psicrotóxicos. O sistema lactoperoxidase é um sistema antimicrobiano natural do leite, que resulta da interação entre a enzima lactoperoxidase, o íon de tiocianato e o peróxido de hidrogênio, que levam à geração de íons e ácidos com potente ação bactericida (MUNSCH-ALATOSSAVA *et al.*, 2018). Entretanto, para que haja a ativação desse sistema é necessária a adição do tiocianato de sódio e de peróxido de hidrogênio, o que é proibido pela legislação brasileira. Em estudo feito por Boulares *et al.* (2011) a ativação do sistema lactoperoxidase a partir de diversas concentrações do tiocianato de sódio e de peróxido de hidrogênio foi avaliada para os leites bovino, caprino e ovino. Os resultados indicaram que com o aumento da concentração do tiocianato de sódio as contagens microbianas reduzem significativamente, sendo as concentrações de 28 mg/L de tiocianato e 60 mg/L de peróxido de hidrogênio as mais adequadas para preservar a qualidade do leite das espécies estudadas.

Outra alternativa estudada são proteínas de leguminosas esterificadas. Sitohy *et al.* (2011) conduziram um estudo para avaliar a capacidade de proteínas nativas e esterificadas de soja e grão de bico de controlarem o crescimento de psicrotóxicos em leite cru de búfala. O leite foi suplementado com 0,5% das proteínas isoladas de leguminosas e estocado a 4 °C por 30 dias. Após a estocagem foi avaliado a contagem total de bactérias, bactérias psicrotóxicas e *Pseudomonas* spp., e foi verificado uma redução significativa nas contagens total de bactérias, bactérias psicrotóxicas e *Pseudomonas* spp. no leite suplementado com as proteínas esterificadas.

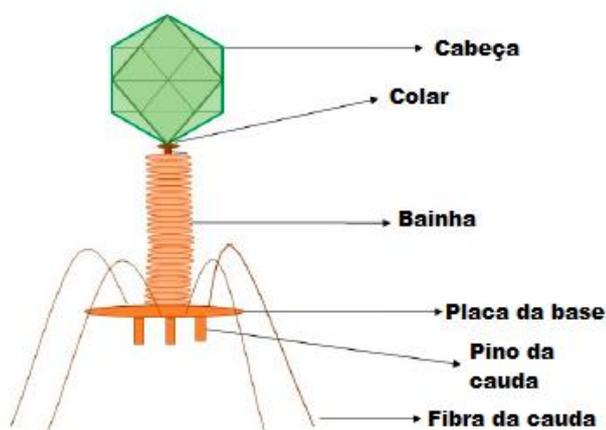
Além das possibilidades supracitadas é possível também utilizar bacteriófagos líticos para o controle do crescimento dos microrganismos psicrotóxicos no leite cru (HU, MENG & LIU, 2016, 2016; TANAKA *et al.*, 2018). Os bacteriófagos são vírus que infectam, especificamente, bactérias e que já são usados como alternativa para controle de bactérias patogênicas, incluindo estirpes resistentes a antimicrobianos (BUENO *et al.*, 2012; DINKAR *et al.*, 2017; EL HADDAD *et al.*, 2016; GÁRCIA *et al.*, 2009; KWIATEK *et al.*, 2015; PERERA *et al.*, 2015; SADEKUZZAMAN *et al.*, 2017; TOMAT *et al.*, 2018). Todavia esse método é pouco estudado para controle de microrganismos deteriorantes em lácteos.

3.3.1 Bacteriófagos

Bacteriófagos são vírus com a capacidade específica de infectar bactérias, sendo inofensivos para os seres humanos, animais e plantas. Desde a sua descoberta em 1915, eles têm sido estudados quanto ao seu potencial para biocontrole de bactérias de interesse na medicina humana e na indústria de alimentos (MARTÍNEZ *et al.*, 2019; PUJATO *et al.*, 2018; SILLANKORVA *et al.*, 2012). Em 2006, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso de bacteriófagos como conservantes de alimentos, podendo ser utilizados como agentes de biocontrole de estirpes bacterianas em legumes frescos, carne e derivados (MOHAMED *et al.*, 2018).

Em geral, os bacteriófagos são exclusivamente compostos por proteínas e ácido nucleico, e a sua morfologia é constituída por uma estrutura de cabeça, que contém o genoma, e uma estrutura de cauda ligada (Figura 2), por meio da qual reconhece, especificamente, o seu hospedeiro (GRATH *et al.*, 2007). A maioria dos bacteriófagos pertence à ordem *Caudovirales*, a qual pode ser subdividida em três famílias diferentes de acordo com a morfologia da cauda. A família *Myoviridae* apresenta cauda longa contrátil, a *Siphoviridae* cauda longa não contrátil e a *Podoviridae* cauda curta não contrátil. O tipo de material genético, que pode variar sendo constituído por DNA (*deoxyribonucleic acid*) ou RNA (*ribonucleic acid*) de fita dupla ou simples, junto da morfologia é utilizado para a classificação dos bacteriófagos (STONE *et al.*, 2019).

Figura 2 – Esquema dos componentes estruturais dos bacteriófagos.



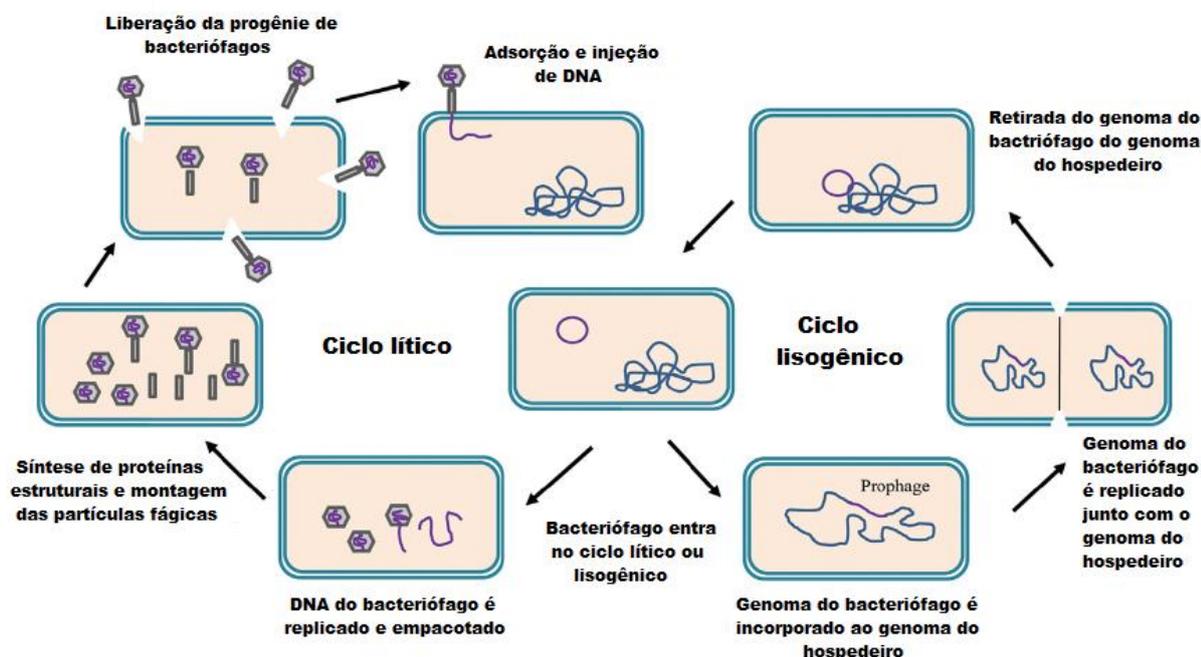
Fonte: Adaptado de STONE *et al.* (2019).

Os bacteriófagos são parasitas intracelulares obrigatórios e para a sua multiplicação assumem a maquinaria de síntese proteica do hospedeiro, podendo causar a lise das células para liberar suas partículas virais formadas (via lítica) ou conduzir a integração da sua informação genética no cromossomo bacteriano (via lisogênica) (SILLANKORVA *et al.*, 2012; YOUNG, 2013). A via lisogênica permite que o bacteriófago se replique, “silenciosamente”, cada vez que a bactéria duplica seu material genético e sofre fissão binária. Quando as condições se tornam favoráveis, o bacteriófago excisa o seu genoma do hospedeiro e entra no ciclo lítico (Figura 3) (MURPHY *et al.*, 2017).

O ciclo lítico pode ser dividido em várias etapas: de ligação, entrada de genoma, replicação, montagem, e liberação das partículas virais. Na etapa de ligação do bacteriófago no ciclo de infecção primeiramente há o reconhecimento de uma molécula como receptor específico na superfície da célula hospedeira e a fixação (adsorção) a este receptor. Para entrada do genoma sugere-se que a partir da ponta da cauda seja projetado um tubo com proteína tampão que desencadeia alteração conformacional na membrana celular do hospedeiro e permite a entrada do genoma. Subsequentemente, há a montagem da estrutura do bacteriófago com a formação do capsídeo e empacotamento do genoma (MURPHY *et al.*, 2017).

No fim do ciclo lítico os bacteriófagos liberam proteínas líticas denominadas holinas e endolisinas. As proteínas holinas se acumulam na membrana interna bacteriana tornando-a permeável às endolisinas. As proteínas endolisinas passam para o periplasma, se tornam ativas e degradam o peptidoglicano. Esse processo leva à ruptura da célula bacteriana e liberação das partículas virais com consequente morte do microrganismo hospedeiro (PUJATO *et al.*, 2018; YOUNG, 2013).

Figura 3 – Ciclo de vida lítico e lisogênico dos bacteriófagos.



Fonte: Adaptado de MURPHY *et al.* (2017).

Os bacteriófagos possuem uma série de vantagens como agentes de biocontrole, pois apresentam alta especificidade em relação ao seu hospedeiro, determinada por receptores da parede celular bacteriana, não afetando a microbiota restante; desenvolvem mecanismos de defesa para a sua sobrevivência, se adaptando continuamente aos hospedeiros; apresentam baixa toxicidade inerente, uma vez que consistem, principalmente, de ácidos nucleicos e proteínas; possuem baixo custo e facilidade de isolamento e propagação; podem suportar as condições de processamento de alimentos e têm vida útil prolongada (MARTÍNEZ *et al.*, 2019; PUJATO *et al.*, 2018; SILLANKORVA *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Danis-Wlodarczyk *et al.* (2015) foi avaliada a eficácia de dois bacteriófagos no controle de biofilme formado por uma estirpe de *P. aeruginosa* e foi observado uma redução de 70 a 90% nas unidades formadoras de colônia em 24 a 72h após a exposição aos bacteriófagos. Dinkar *et al.* (2017) avaliaram a capacidade de quatro bacteriófagos controlarem estirpes de *P. fluorescens* resistentes a antibióticos causadoras de infecções em peixes e

verificaram que os bacteriófagos controlaram o crescimento dessa bactéria e toleram as condições de meio existentes na aquacultura.

Em outro estudo feito por Mohamed *et al.* (2018) avaliou-se a eficácia de um coquetel de bacteriófagos sobre estirpes de *E. coli* isoladas de pacientes com diarreia, mostrando atividade inibitória sobre as estirpes avaliadas. O uso terapêutico dos bacteriófagos tem ganhado destaque em função do surgimento de bactérias resistentes a antibióticos (CISEK *et al.*, 2017). Já existem estudos em humanos com administração intravenosa de bacteriófagos em casos de infecção por estirpes resistentes, evidenciando a sua eficácia (ASLAM *et al.*, 2019; JENNES *et al.*, 2017).

3.4 BACTERIÓFAGOS E LÁCTEOS

Os bacteriófagos durante muitos anos foram considerados inimigos da indústria de laticínios pelo fato de infectarem as culturas lácticas, todavia também podem ser considerados aliados em função do seu potencial de controle de alguns microrganismos patogênicos ou deteriorantes (MARTÍNEZ *et al.*, 2019; PUJATO *et al.*, 2018).

As bactérias ácido-lácticas (BAL) abrangem um grande grupo de bactérias Gram-positivas encontradas em vários nichos ecológicos, e algumas estirpes são utilizadas para fermentação do leite e fabricação de derivados lácteos. Historicamente o uso das BAL autóctones para a fermentação do leite foi uma maneira eficaz de estender o prazo de validade deste alimento. A seleção das culturas de BAL comerciais domina o mercado e proporciona à indústria de laticínios a produção de derivados lácteos com características específicas de sabor, aroma e textura (MURPHY *et al.*, 2017). Assim, como grande parte dos derivados lácteos é produzida com base em processos fermentativos bacterianos, a contaminação dessas estirpes por bacteriófagos pode levar a grandes prejuízos para a indústria de laticínios.

Os bacteriófagos conhecidos que infectam as BAL pertence à ordem *Caudovirales*, caracterizada por um genoma de DNA de cadeia dupla envolto por capsídeo ligado a uma cauda. O principal sinal de infecção por bacteriófagos em um processo de fermentação do leite é a diminuição da atividade da cultura *starter*, o que leva a uma interrupção da acidificação (PUJATO *et al.*, 2018).

A infecção fágica das culturas lácteas é uma das principais causas de falhas na fermentação (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017; PUJATO *et al.*, 2018). A fonte de entrada de bacteriófagos nas instalações se dá, principalmente, por meio do leite cru (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017; GIRAFFA *et al.*, 2017; MURPHY *et al.*, 2017) e de prófagos presentes nas culturas lácticas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017). O leite cru pode conter até 10^4 unidades formadoras de placas (UFP) por ml, sendo que concentrações de 10^2 UFP por mL já podem causar problemas nos processos fermentativos (PUJATO *et al.*, 2018). Em função da resistência térmica apresentada por alguns deles, há um aumento da sua titulação no leite pasteurizado e no soro de leite, podendo alcançar valores de até 10^9 UFP/mL (GIRAFFA *et al.*, 2017).

Os fermentos de BAL que apresentam prófagos, sob certas condições, tais como temperatura flutuante, pH reduzido e sal, podem ter o ciclo lítico do prófago ativado e iniciar a replicação e a liberação da descendência de bacteriófagos durante o processo fermentativo. A análise extensiva deve ser realizada em potenciais estirpes utilizadas nas culturas de arranque antes da sua utilização para a produção de derivados lácteos, a fim de determinar a presença ou ausência de prófagos e o risco de indução do ciclo lítico dos existentes sob várias condições (MURPHY *et al.*, 2017). Outras vias de contaminação dos produtos lácteos nas instalações industriais incluem movimentação de pessoal e equipamentos, manuseio de matérias-primas, deslocamentos aéreos de respingos de líquidos de superfícies contaminadas, que podem aerossolizar os bacteriófagos presentes e causar sua disseminação através das partículas no ar para todo o ambiente fabril (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017; PUJATO *et al.*, 2018).

Além dos problemas causados pelos bacteriófagos que infectam as BAL, muitos outros têm sido utilizados como aliados da indústria de lácteos como desinfetantes e conservantes. O uso dos bacteriófagos possui várias vantagens sobre os desinfetantes convencionais, como uma gama estreita de hospedeiros, eficácia contra bactérias resistentes a antimicrobianos, assim como o fato de serem uma medida natural (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017). Em estudo feito por García *et al.* (2009) foram utilizados bacteriófagos para o controle de estipes de *Staphylococcus aureus* em leite cru, pasteurizado e UHT integral, no qual foi verificado a inibição do crescimento das estipes de *S. aureus* nas amostras inoculadas com um mix de bacteriófagos. De forma similar, bacteriófagos têm sido aplicados para inativação de

S. aureus em queijos frescos e maturados e na prevenção da formação de biofilme (BUENO *et al.*, 2012; EL HADDAD *et al.*, 2016).

Os bacteriófagos também têm sido aplicados para o controle de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. O ListShield™ é um coquetel de bacteriófagos comercialmente disponível que visa, especificamente, o controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos, reduzindo em até 90% a contaminação por essa bactéria (PERERA *et al.*, 2015; SADEKUZZAMAN *et al.*, 2017). Outro produto disponível é o Listex™ P100, que é eficiente contra todas as espécies de *Listeria* e pode ser utilizado na superfície de queijos duros e nas superfícies de contato com alimentos (PHAGEGUARD, 2016). Silva *et al.* (2014) avaliaram o efeito do Listex™ P100 em queijos Minas frescal e Coalho e verificaram redução de 2,3 e 2,1 ciclos log, respectivamente, na contagem de *Listeria* nas amostras tratadas com bacteriófagos.

O sucesso da utilização de bacteriófagos para controle de *Escherichia coli* também levou ao desenvolvimento de um produto à base de bacteriófagos líticos, o EcoShield™, da empresa Intralytix Inc., que é comercializado como uma preparação aquosa concentrada de bacteriófagos, e foi projetado, especificamente, para tratar alimentos que estão sob alto risco de contaminação. Em estudo realizado por Tomat *et al.* (2018) foi avaliado um coquetel de bacteriófagos líticos para o controle de estirpes de *E. coli* em diferentes matrizes alimentares e temperaturas. As contagens de células de *E. coli* reduziram, significativamente, na matriz leite ficando abaixo do limite de detecção ($<10^1$ UFC/mL) a 4 °C e reduzindo de 2 a 4 log UFC/mL a 24 °C após 24h de exposição.

Em estudo feito por Hu, Meng e Liu (2016) na China, foram isolados bacteriófagos para *Pseudomonas* spp. a fim de avaliar a sua capacidade de prevenção da deterioração do leite cru. A maioria dos bacteriófagos isolados apresentou alta capacidade de infecção das estirpes testadas. Obteve-se a redução de 2 ciclos log na contagem de *Pseudomonas*, após 24h, quando utilizado no leite um coquetel dos vírus isolados, evidenciando a possibilidade de uso dos bacteriófagos como agentes de biocontrole da deterioração do leite. Em outro estudo realizado no Japão, Tanaka *et al.* (2018) avaliaram a inibição de *P. lactis* em leite cru por bacteriófagos e verificaram a redução de 1 ciclo log na contagem de células bacterianas viáveis após três dias de incubação a 3 °C. Esses estudos demonstram o potencial de utilização dos bacteriófagos para o controle de microrganismos de

interesse na matriz leite. Todavia são necessários mais estudos para avaliar o potencial de diferentes bacteriófagos isolados, se há interação dos mesmos com as bactérias ácido-lácticas e a sua eficácia em reduzir a atividade das proteases e, por consequência, a proteólise do leite cru.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises e os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em Juiz de Fora – MG.

4.1 MICRORGANISMOS

Neste estudo foram utilizadas três estirpes de *P. fluorescens* para isolamento e propagação dos bacteriófagos, sendo estas *P. fluorescens* UFV 041 e *P. fluorescens* UFV 07A isoladas por Pinto *et al.* (2006) de amostras de leite cru, e a estirpe *P. fluorescens* NCTC 10038 isolada por Rhodes (1959) de amostras de água. Foram utilizadas outras estirpes de *Pseudomonas* spp. e bactérias de diferentes gêneros (Tabela 1) para avaliar a especificidade dos bacteriófagos isolados e selecionados. Os microrganismos usados no estudo foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) ou isolados de fermentos lácteos das empresas Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. e DSM *Company*. Todos os microrganismos foram armazenados em caldo Triptona de Soja (TSB), contendo 20 % de glicerol como crioprotetor, e congelados a – 80 °C.

Tabela 1 – Estirpes bacterianas utilizadas no teste de especificidade dos bacteriófagos isolados e selecionados.

Microrganismo	INCQS	ATCC
<i>Pseudomonas putida</i>	00113	15175
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	00069	14909
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	00520	31258
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00313	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00386	-
<i>Escherichia coli</i>	00032	11229
<i>Escherichia coli</i>	00310	11775
<i>Listeria innocua</i>	-	33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	00266	7644
<i>Salmonella typhi</i>	-	6539

(continua)

(continuação)		
<i>Salmonella enteritidis</i>	00258	13076
<i>Enterococcus faecalis</i>	00154	19433
<i>Staphylococcus aureus</i>	00013	6538
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	00383	9649
<i>Lactobacillus paracasei</i>	00222	335
Microrganismo	INCQS	ATCC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	00223	9595
<i>Lactobacillus helveticus</i>	00227	12046
<i>Lactococcus lactis</i>	00665	11454
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i>	Isolados do fermento YF-L903 (1)	
<i>Streptococcus thermophilus</i>		
<i>Lactobacillus casei</i>	Isolado do fermento <i>Lafti L26-DSL</i> (2)	

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

ATCC - American Type Culture Collection.

1 - Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. 2 - DSM Company.

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos foram isolados a partir de amostras de água de rios, córregos, esgoto doméstico, lago e efluentes de laticínios (Tabela 2 – Item 5), da região da Zona da Mata de Minas Gerais (Juiz de Fora-MG e Viçosa-MG), no período de março de 2016 a fevereiro de 2018. As amostras foram coletadas em frascos estéreis e transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Os bacteriófagos foram isolados por meio de metodologia adaptada de Sillankorva *et al.* (2008). De cada amostra coletada foi retirada uma alíquota de 10 mL e adicionada em frasco erlenmeyer contendo 10 mL de meio TSB dupla concentração, acrescido de 50 µL de inóculo das três estirpes de *P. fluorescens* cultivadas *overnight* (10^8 UFC/mL) e, em seguida, incubados a 30 °C, por 24h. Após o período de incubação o conteúdo foi centrifugado a 2.202 g, por 10 min e o sobrenadante filtrado em membranas de acetato de celulose com poro de 0,45 µm, a fim de eliminar restos celulares. A detecção dos bacteriófagos líticos na suspensão filtrada foi realizada segundo metodologia descrita por Adams (1959). Em placas de ágar Tripton de Soja (TSA) com sobrecamada de TSB (0,7 % de ágar-ágar) acrescido de 500 µL de inóculo de *P. fluorescens* cultivada *overnight* (10^8 UFC/mL), foi inoculada uma microgota (20 µL) da suspensão e incubado, a 30 °C, por 24h. As

suspensões foram testadas para as três estirpes de *P. fluorescens* utilizadas como hospedeiros.

Posteriormente, realizou-se o processo de purificação dos bacteriófagos líticos encontrados, segundo metodologia descrita por Grawjewski *et al.* (1985), com adaptações. A suspensão na qual foi detectada a presença de bacteriófagos foi diluída em tampão SM (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 0,01% gelatina) por meio de diluições seriadas (1/10) até 10⁻⁷. Em seguida procedeu-se a inoculação de microgotas (20 µL) de cada diluição em placas de TSA com sobrecamada de TSB (0,7 % de ágar-ágar), acrescido de 500 µL de inóculo de *P. fluorescens* hospedeira cultivada *overnight* (10⁸ UFC/mL). As placas de Petri inoculadas foram secas em cabine de fluxo laminar e incubadas a 30 °C, por 24h. Após a incubação, foi selecionada uma placa de lise isolada de cada amostra que foi removida com auxílio de alça ou agulha bacteriológica e transferida para tubo contendo 10 mL caldo TSB e 50 µL de *P. fluorescens* cultivada *overnight* (10⁸ UFC/mL). Em seguida, os tubos inoculados foram incubados a 30 °C, por 24h. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 2.202 g, por 10 min, filtrada em membranas de acetato de celulose com poro de 0,45 µm e recolhida em novo tubo de ensaio. Este processo foi repetido três vezes para garantir a purificação dos bacteriófagos a partir das placas de lise isoladas. A estirpe de *P. fluorescens* utilizada na purificação como hospedeiro variou de acordo com os resultados do teste de detecção, sendo utilizada a mesma estirpe para a qual o bacteriófago apresentou inicialmente placa de lise.

As atividades do presente trabalho envolvendo o acesso ao patrimônio genético foram cadastradas no Sisgen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o número AE83316.

4.3 DETERMINAÇÃO DA TITULAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

A titulação foi determinada conforme metodologia descrita por Adams (1959). Procedeu-se a diluição seriada até 10⁻⁷ em tampão SM da suspensão de bacteriófagos purificada. Em seguida foram retiradas alíquotas de 20 µL de cada diluição e inoculadas em placas de TSA com sobrecamada de TSB (0,7 % de ágar-ágar) acrescido de 500 µL de inóculo da bactéria hospedeira cultivada *overnight* (10⁸ UFC/mL) e incubado a 30 °C, por 24h. Após a incubação, realizou-se a contagem de

placas de lise e a conversão dos resultados obtidos para título de bacteriófagos em UFP/mL e Log UFP/mL. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PLACAS DE LISE DOS BACTERIÓFAGOS

O diâmetro das placas de lise foi avaliado por meio de fotografias das placas de lise, retiradas por meio de aparelho telefônico, obtidas a partir das diluições (10^{-1} a 10^{-7}). As imagens foram ampliadas no programa PowerPoint da *Microsoft*, a medida de pelo menos três placas de lise isoladas foram determinadas para os cálculos, a partir de uma referência métrica (10 mm).

4.5 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS BACTERIÓFAGOS

A especificidade de infecção dos bacteriófagos sobre outras bactérias (Tabela 1) foi avaliada pelo método de eficiência de plaqueamento – EOP (EOP = título do bacteriófago sobre a bactéria teste em UFP/mL / título do bacteriófago sobre a bactéria hospedeira em UFP/mL) descrito por Viazis *et al.* (2011). Alíquotas de 20 μ L da suspensão de bacteriófagos purificada foram inoculadas em placas de TSA com sobrecamada de TSB (0,7 % de ágar-ágar) adicionado de 500 μ L da bactéria teste (10^8 UFC/mL) e incubadas a 30 °C, por 24h ou a 35 °C, por 24h. A temperatura de incubação variou de acordo com a temperatura ótima para crescimento de cada bactéria avaliada. Após a incubação, foi avaliada a presença ou ausência de placas de lise para as bactérias testadas. Para as bactérias que apresentaram placas de lise foram realizados testes para a determinação da titulação conforme metodologia descrita por Adams (1959). Valores de EOP de 0,5 a 1 foram considerados de alta eficiência, valores de 0,2 a 0,5 de média eficiência, valores 0,001 a 0,2 de baixa eficiência, e valores de 0,0 como não efetivos contra a estirpe avaliada.

4.6 PROPAGAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos foram propagados a partir da suspensão purificada seguindo metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001), com adaptações. Em placas de

TSA com sobrecamada de TSB (0,7 % de ágar-ágar), acrescido de 500 µL de inóculo da bactéria hospedeira cultivada *overnight* (10^8 UFC/mL), foram inoculadas nove microgotas (20 µL) da suspensão de bacteriófagos purificada. As placas foram incubadas a 30 °C, por 24h. Após o período de incubação, 5 mL de tampão SM foram adicionados em cada placa e em seguida foram homogeneizadas em *shaker* a 100 rpm a 4 °C, por 24h. Posteriormente, o líquido das placas foi transferido para tubos de centrifuga estéreis, adicionados de 3 mL de solução de cloreto de sódio 5 M, incubados em banho de gelo por uma hora e em seguida centrifugados a 11.000 g a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo de centrifuga, adicionado de 10% de Polietilenoglicol 8000, homogeneizado em vórtex e incubados a 4 °C *overnight*. Após a incubação, procedeu-se a centrifugação dos tubos a 11.000 g a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 5 mL de tampão SM, homogeneizado em vórtex e mantido em repouso por uma hora, a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 5 mL de clorofórmio aos tubos, para inativação do hospedeiro, homogeneizados em vórtex e centrifugados a 3.000 g, a 4 °C, por 15 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm e armazenado em tubos estéreis a 4 °C.

4.7 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DOS BACTERIÓFAGOS (*One-step Growth*)

O experimento de *one-step growth* foi realizado conforme metodologia de Kropinski (2018). Foi adicionado 1 mL de caldo TSB com *P. fluorescens* cultivada *overnight* (10^7 UFC/mL) em frasco contendo 8,9 mL de meio TSB, e em seguida foi inoculado 100 µL da suspensão de bacteriófago (10^6 UFP/mL) (frasco de adsorção). O frasco foi incubado em banho-maria (30 °C) por 5 min, e após esse período, uma alíquota de 100 µL foi retirada e adicionada a um frasco contendo 9,9 mL de caldo TSB (frasco A). Do frasco A foi retirada uma alíquota de 1 mL e adicionada a um frasco contendo 9,0 mL de caldo TSB (frasco B). Do frasco B foi retirada uma alíquota de 1 mL e adicionada a um frasco contendo 9,0 mL de caldo TSB (frasco C). Os frascos foram incubados em banho-maria e em intervalos de tempo pré-determinados foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada frasco (A, B e C) adicionadas em tubos contendo meio TSB (0,7 % de ágar-ágar) acrescido de 500 µL de inóculo da bactéria hospedeira cultivada *overnight* (10^8 UFC/mL) e plaqueados.

Simultaneamente do frasco A foi retirada uma alíquota de 100 µL que foi adicionada a um tubo contendo 1 mL de clorofórmio, sendo retirada uma alíquota de 100 µL adicionada em um tubo contendo meio TSB (0,7 % de ágar-ágar) acrescido de 500 µL de inóculo da bactéria hospedeira cultivada *overnight* (10^8 UFC/mL) e plaqueado para verificação de bacteriófagos não adsorvidos. As placas foram incubadas a 30 °C, por 24h. Após a incubação realizou-se a contagem de placas de lise e a conversão dos resultados obtidos para título de bacteriófagos em UFP/mL e Log UFP/mL. O *burst size* (número de partículas fágicas da progênie liberadas por célula infectada) dos bacteriófagos foi calculado através da divisão da média em UFP/mL do platô superior pela média em UFP/mL do platô inferior subtraída do número de bacteriófagos não adsorvidos.

4.8 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DO GENOMA DOS BACTERIÓFAGOS

Para a determinação do tamanho do genoma dos bacteriófagos foi utilizada a eletroforese em campo pulsado (PFGE) conforme metodologia adaptada de Lingohr *et al.* (2009). Para o preparo dos *plugs* foi utilizado 400 µL da suspensão de bacteriófagos, a 50 - 54 °C, com titulação entre 10^6 e 10^{10} UFP/mL, preparada conforme Sambrook e Russel (2001), adicionada de 400 µL de agarose a 1,2% p/v e, posteriormente, dispensados nos moldes e solidificados em temperatura ambiente (24 °C). Após a solidificação, os *plugs* foram adicionados em tubos contendo 5 mL de tampão de lise (50mM Tris, 50mM EDTA, 1% (p/v) SDS) e 25 µL de proteinase K e incubados em banho-maria a 54 °C com agitação, por duas horas. Após o período de incubação, o tampão de lise foi removido e adicionado de 5 mL de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA [pH 8.0]) e mantidos em banho-maria a 54 °C com agitação por 15 min. Em seguida, o tampão TE foi removido e um novo volume de tampão TE foi adicionado aos *plugs*, que foram mantidos em banho-maria novamente, a 54 °C com agitação por 15 min. Os *plugs* foram armazenados em tampão TE, a 4 °C.

Fatias dos *plugs* de aproximadamente 2 mm foram adicionadas na parte inferior do pente, deixados secar e posicionados na bandeja de gel à qual foi adicionado o gel de agarose 1% p/v e deixado solidificar, por 30 min. Após a solidificação, o pente foi removido e adicionada uma fatia de aproximadamente 1 mm do marcador (MidRange PFG Marker N0342S – BioLabs - DNA isolado do bacteriófago λ) em um dos poços do gel e coberto com agarose 1% p/v. A seguir o

gel foi removido da bandeja e posicionado na cuba de PFGE com tampão de corrida TBE 0,5X (45mM Tris borato, 1mM EDTA). As condições de eletroforese utilizadas foram 6V/cm durante 17h a temperatura de 14 °C com tempos de pulsos de 1 a 25 segundos. Posteriormente, o gel foi removido e corado em brometo de etídio (1 µg/mL) por 20 min e depois lavado em água destilada por 30 min.

O gel foi examinado sob luz ultravioleta e fotodocumentado através do fotodocumentador para gel de eletroforese L-PIX (Loccus Biotecnologia), e analisado no programa *GelAnalyser* 19.1 (<http://www.gelanalyzer.com/index.html>) para determinação do tamanho do genoma dos bacteriófagos.

4.9 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS BACTERIÓFAGOS

A avaliação da resistência térmica dos bacteriófagos foi realizada conforme metodologia adaptada de Quiberoni *et al.* (2003). Alíquotas de 100 µL da suspensão de bacteriófago foram adicionadas em 900 µL de tampão SM previamente aquecido (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 0,01% gelatina) e incubadas em banho-maria a 63 °C e 72 °C, durante 30 min. A cada cinco minutos de tratamento térmico, alíquotas de 100 µL foram retiradas, resfriadas em banho de gelo e diluídas (10⁻¹ a 10⁻⁷) em tampão SM à temperatura ambiente para posterior determinação da titulação dos bacteriófagos. Microgotas de 20 µL foram inoculadas em TSA com sobrecamada de TSB (0,7 % de ágar-ágar) adicionado da bactéria hospedeira (10⁸ UFC/mL) e incubados a 30 °C, *overnight*. Após a incubação as placas de lise formadas foram contadas e o título dos bacteriófagos determinado. Foram realizadas três repetições para cada temperatura.

4.10 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS BACTERIÓFAGOS A SANITIZANTE

A resistência a sanitizante dos bacteriófagos foi feita conforme método descrito por Mercanti *et al.* (2012). As suspensões de bacteriófagos com titulações entre 10⁷ - 10⁹ UFP/mL foram incubadas com a solução sanitizante, à base de hipoclorito de sódio nas concentrações de 50 mg/L e 200 mg/L, a 25 °C, por 30 min. Posteriormente, a mistura foi acrescida de tiosulfato de sódio a 10% e então

determinada a titulação dos bacteriófagos pelo método de titulação em placas de camada dupla. As diluições do hipoclorito de sódio foram feitas em tampão SM (pH 7,5). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.11 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS BACTERIÓFAGOS A DIFERENTES FAIXAS DE pH

A resistência dos bacteriófagos às diferentes faixas de pH foi feita conforme método descrito por Sun *et al.* (2012) com adaptações. Alíquotas de 100 µL da suspensão de bacteriófago com titulações entre 10^7 - 10^9 UFP/mL foram inoculadas em 900 µL de solução de peptona 1%. Posteriormente 100 µL dessa suspensão foi inoculada em soluções de peptona 1% com pH ajustado (2, 5, 7, 9 e 11). Após 60 min de incubação a 25 °C, alíquotas foram retiradas, diluídas em tampão SM e determinada a titulação dos bacteriófagos.

4.12 EFEITO DOS BACTERIÓFAGOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *P. fluorescens*

P. fluorescens foi cultivada em caldo TSB, a 30 °C, *overnight*, centrifugada (5.000 g, por 5 min a 4 °C) e ressuspensa em solução de NaCl 0,85 %. Frascos erlenmeyers contendo meio complexo (peptona 5 g/L e extrato de carne 3 g/L) suplementado com 1 % de *skim milk* foram inoculados com suspensão de *P. fluorescens* para concentração de 10^3 UFC/mL. Bacteriófagos foram adicionados ao cultivo microbiano (tratamento) para multiplicidade de infecção (MOI – razão entre o título de fagos e a concentração de bactérias) de 10.000 (equivalente a 10^7 UFP/mL) no início do crescimento. Meios de cultivo acrescidos de *P. fluorescens* e sem a adição de bacteriófagos foram utilizados como controle positivo. Os cultivos foram incubados a 4 e a 10 °C, por 7 dias, sob agitação de 50 rpm e avaliados quanto à contagem de *P. fluorescens* a cada 24h. O crescimento bacteriano foi verificado pela contagem de colônias crescidas em ágar TSA pelo método de plaqueamento em superfície (microgotas) com incubação a 30 °C por 48 h.

4.13 EFEITO DE BACTERÍOFAGOS SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *P. fluorescens*

A atividade proteolítica de *P. fluorescens* em meio complexo contendo 1% de *skim milk* na presença ou não de bacteriófagos líticos foi quantificada usando-se azocaseína como substrato, conforme metodologia descrita por Ewings *et al.* (1984). Amostras de meio de cultivo coletadas em cada condição avaliada no item anterior foram centrifugadas a 3.000 g, por 20 min e submetidas à análise de atividade proteolítica. Uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo e adicionada de 500 µL de azocaseína 0,5% e de 500 µL de tampão Tris-HCl (0,1 mol/L, pH 7,5 e 1 mL de Tris-HCl 0,1 mol/L), pH 7,5. A seguir os tubos foram incubados a 37 °C, por duas horas em banho-maria. Foi adicionada à mistura 900 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) e posteriormente os tubos foram transferidos para banho de gelo, por 15 min. Após o período de resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g, por 10 min, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 366 nm, em espectrofotômetro. Leituras de absorbância de amostras de cada condição experimental sem incubação (a 37 °C por duas horas) foram utilizadas como controle negativo e descontadas nas leituras espectrofotométricas de cada amostra correspondente. Os resultados foram plotados em gráfico em função do tempo de incubação, e as diferenças de leitura de absorbância entre controle e tratamento foram avaliadas.

4.14 EFEITO DE BACTERÍOFAGOS SOBRE PROTEÓLISE CAUSADA POR *P. fluorescens*

O efeito do tratamento com bacteriófagos sobre as proteínas do meio de cultivo complexo à base de leite foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE, seguindo metodologia descrita por Laemmli (1970) com algumas modificações.

Amostras de meio de cultivo coletadas em cada condição avaliada no item 4.12 foram centrifugadas a 6.000 g, por 5 min. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e acidificado para pH 4,0 com HCl 1M para precipitação das proteínas. As proteínas precipitadas foram centrifugadas a 6.000 g por 5 min, lavadas em água

ultrapura esterilizada e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8. O conteúdo proteico das amostras ressuspendidas foi determinado por meio de metodologia de Lowry *et al.* (1951), utilizando caseína na elaboração da curva padrão (50 ug/mL a 500 ug/mL). As amostras foram preparadas para a análise de eletroforese SDS-PAGE pela adição de tampão de corrida e amostra na concentração final de proteína ajustada em 30 µg. As amostras foram desnaturadas a 100 °C por 10 min e, posteriormente, aplicadas em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida a 15 % para separação das proteínas e gel de poliacrilamida a 4,5 % para empilhamento, ambos contendo SDS. Os géis foram polimerizados pela adição de 0,025 % (v/v) de tetrametileno diamina (TEMED) e 0,05 % (p/v) de persulfato de amônio. O tampão de corrida foi preparado com Tris-base, glicina e SDS com pH corrigido para 8,6. A eletroforese foi conduzida a 100 V por duas horas para separação das frações proteicas. Os géis foram corados, por duas horas à temperatura ambiente com solução de azul brilhante de Coomassie R a 0,2 % em metanol: ácido acético: água (1:2:17 v/v). O gel corado foi disposto em solução de ácido acético para revelação das frações de proteínas. Foram utilizados padrões de peso molecular (*Precision Plus ProteinTM Standards - BioRad*) e de caseína para comparação dos resultados. Os géis foram escaneados em scanner hp Scanjet 2400 para avaliação da degradação de bandas de proteínas nas amostras ao longo do tempo de armazenamento refrigerado.

4.15 EFEITO DOS BACTERÍOFAGOS SOBRE A CONTAGEM DE *Pseudomonas* spp., PSICROTRÓFICOS E MESÓFILOS EM LEITE CRU

As amostras de leite cru utilizadas nesta pesquisa foram obtidas de forma higiênica a fim de reduzir ao máximo a carga microbiana inicial, coletadas em fracos estéreis e transportadas em caixa isotérmica ao Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Foram realizados quatro tipos de tratamentos: Leite cru, contendo a microbiota inerente ao processo de obtenção do leite; Leite cru adicionado de bacteriófagos; Leite cru adicionado de bactérias; e Leite cru adicionado de bactérias e bacteriófagos. Os bacteriófagos Ph6 e Ph32 foram liofilizados em matriz de leite desnatado esterilizado (121 °C /15 min) e adicionados ao leite cru para atingir

concentrações finais de 10^7 UFP/mL. As células de *P. fluorescens* UFV 041 foram cultivadas *overnight* em caldo TSB e centrifugadas a 5.000 g por 5 min a 4 °C e ressuspensas em solução de NaCl 0,85 % (p/v). Foram realizadas diluições seriadas da suspensão de células em solução de NaCl 0,85 % (p/v) para obter a concentração final no leite cru de 10^3 UFC/mL. As amostras de cada tratamento foram armazenadas a 4°C sob agitação de 100 rpm e avaliadas quanto a contagem de *Pseudomonas* spp., microrganismos psicrótróficos e mesofílicos a cada 24 h durante 7 dias de armazenamento.

A contagem de *Pseudomonas* spp. foi realizada por plaqueamento em superfície em ágar *Pseudomonas* base suplementado com CFC (Cetrimida: 0,01 mg/mL; Fucidin: 0,01 mg/mL; Cefalosporina: 0,05 mg/mL), e as placas foram incubadas a 30 °C, durante 48 h. As contagens de psicrótróficos e mesófilos foram realizadas por plaqueamento em superfície em ágar padrão para contagem (PCA - *Plate Count Agar*), com incubação a 7 °C por 10 dias e 35 °C por 48 h, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados de contagem foram transformados em Log UFC/mL para elaboração dos gráficos.

4.16 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados referentes à titulação dos bacteriófagos e ao tamanho das placas de lise foram analisados comparando-se as médias apresentadas pelos diferentes bacteriófagos, por meio da análise de variância e teste t de *Student* a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas 47 amostras e isolados 18 bacteriófagos para *P. fluorescens* os quais foram caracterizados e testados quanto ao seu potencial para controle biológico.

5.1 ISOLAMENTO DOS BACTERIÓFAGOS

Das 47 amostras das diferentes fontes analisadas, 36,2% apresentaram bacteriófagos para pelo menos uma das três bactérias hospedeiras utilizadas, enquanto que apenas 2,1% dessas amostras positivas apresentaram bacteriófagos para mais de uma estirpe (Tabela 2). Aproximadamente 66,7% dos bacteriófagos foram isolados de amostras de água de córrego ou rio e 33,3% de amostras de efluente de laticínios. O maior percentual de isolamento de bacteriófagos em amostras de córregos ou rio pode estar relacionado à maior diversidade biológica existente nesses locais, principalmente pelo fato de receberem águas residuais de diferentes origens. Em vários estudos o sucesso de isolamento de bacteriófagos deu-se a partir de amostras de águas residuais, o que confirma que esse tipo de amostra é uma fonte desses agentes para diferentes estirpes bacterianas (DANIS-WLODARCZYK *et al.*, 2015; HU, MENG & LIU, 2016; KWIATEK *et al.*, 2015; SHIGEHISA *et al.* 2016).

No presente estudo foram isolados 18 bacteriófagos para as três estirpes de *P. fluorescens* estudadas, dos quais 66,7% foram para *P. fluorescens* UFV 041, 27,8% para *P. fluorescens* UFV 07A e apenas 5,6% para *P. fluorescens* NCTC 10038. As estirpes de *P. fluorescens* UFV 041 e UFV 07A foram isoladas previamente de amostras de leite cru refrigerado granelizado de uma indústria da Zona da Mata Mineira no Brasil (PINTO, 2004), enquanto que *P. fluorescens* NCTC 10038 foi isolada de amostras de água da Inglaterra (RHODES, 1959). Esse fato pode explicar o maior número de bacteriófagos isolados para as primeiras duas estirpes de *P. fluorescens* em comparação com a última.

Tabela 2 – Isolamento de bacteriófagos para estirpes de *P. fluorescens* a partir de diferentes amostras coletadas na região da Zona da Mata de Minas Gerais/Brasil.

Fonte de isolamento	Amostra	Presença/Ausência de lise por estirpe de <i>P. fluorescens</i> testada		
		P. f. UFV 041	P. f. UFV 07A	P.f. NCTC 10038
Efluente de laticínio	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	+	-	-
	5	-	-	-
	6	+	-	-
	7	-	-	-
	8	+	-	-
	9	-	-	-
	10	-	-	-
Efluente de laticínio	11	+	-	-
	12	+	-	-
	13	-	-	-
	14	-	-	-
	15	-	-	-
	16	-	-	-
	17	-	-	-
	18	-	-	-
	19	-	-	-
	20	-	-	-
	21	+	-	-
Esgoto doméstico	22	-	-	-
	23	-	-	-
	24	-	-	-
	25	-	-	-
	26	-	-	-
Água de córrego	27	-	-	-
	28	-	-	-
	29	-	-	+
	30	-	-	-
	31	-	+	-
	32	+	+	-
	33	-	-	-
	34	+	-	-
	35	+	-	-
	36	-	+	-
37	+	-	-	
38	+	-	-	
Água de rio	39	-	-	-
	40	-	-	-
	41	-	+	-
	42	-	-	-
	43	+	-	-
	44	-	-	-
	45	-	+	-
46	-	-	-	
Lago	47	-	-	-

“+” presença. “-” ausência.

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Os testes de caracterização consistiram em determinar a titulação, tamanho das placas de lise, especificidade, *one-step growth*, tamanho de genoma, resistência ao tratamento térmico, ao sanitizante e estabilidade a diferentes faixas de pH.

5.2.1 Titulação, tamanho das placas de lise e especificidade

Sete bacteriófagos, dos 18 isolados, foram selecionados em função da transparência das placas de lise apresentadas, origem da amostra e da bactéria hospedeira para uma caracterização preliminar. Foram selecionados três bacteriófagos por estirpe bacteriana, exceto para *P. fluorescens* NCTC 10038 para a qual foi isolado apenas um bacteriófago. A etapa de caracterização preliminar (Tabela 3) compreendeu a determinação da titulação, do tamanho das placas de lise e a especificidade de hospedeiros (Tabela 1).

Tabela 3 – Caracterização preliminar dos bacteriófagos quanto à titulação, tamanho de placas de lise e especificidade de hospedeiros. Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

Bacteriófago	Titulação (Log/UFP/mL)	Tamanho das placas de lise (mm)	Hospedeiro	Especificidade
Ph4	9,58 ± 0,22 ^a	0,70 ± 0,10 ^d	<i>P.f.</i> UFV 041	-
Ph6	9,72 ± 0,18 ^a	0,51 ± 0,05 ^{de}	<i>P.f.</i> UFV 041	-
Ph32	7,60 ± 0,06 ^e	2,67 ± 0,20 ^a	<i>P.f.</i> UFV 041	<i>L. innocua</i> *; <i>P. aeruginosa</i> 313*
Ph41	8,98 ± 0,06 ^b	1,37 ± 0,12 ^c	<i>P.f.</i> UFV 07A	<i>P.f.</i> UFV 041*; <i>P. putida</i> (EOP=0,52)
Ph45	8,19 ± 0,04 ^d	1,77 ± 0,06 ^b	<i>P.f.</i> UFV 07A	<i>P.f.</i> UFV 041*; <i>P. putida</i> (EOP=0,75)
Ph31	9,20 ± 0,10 ^b	1,63 ± 0,12 ^b	<i>P.f.</i> UFV 07A	<i>P. putida</i> (EOP=0,94)
Ph29	8,48 ± 0,18 ^c	0,39 ± 0,03 ^e	<i>P.f.</i> NCTC	-

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste t de *Student*.

* Não foi possível calcular o EOP.

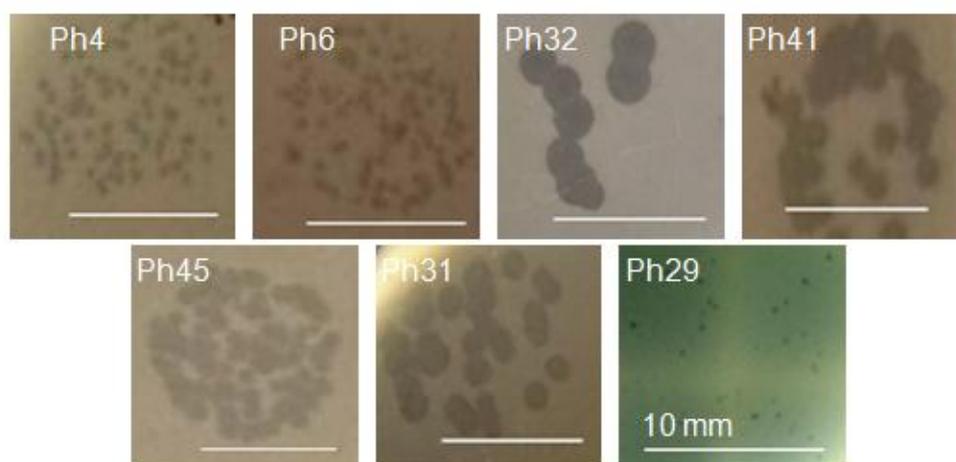
- Ausência de placas de lise para todas as bactérias avaliadas.

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

A titulação dos bacteriófagos variou de $7,60 \pm 0,06$ a $9,72 \pm 0,18$ Log UFP/mL. Os bacteriófagos Ph4 e Ph6 apresentaram as maiores titulações, com valores superiores a 9 Log UFP/mL, diferindo significativamente dos demais bacteriófagos ($p < 0,05$). Esses resultados são semelhantes aos títulos já relatados por outros estudos para bacteriófagos isolados para *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, que variaram de 7 a 9 Log UFP/mL (AHIWALE *et al.*, 2012; DANIS-WLODARCZYK *et al.*, 2015; HU, MENG & LIU, 2016; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2012). Suspensões com altos títulos favorecem a propagação dos bacteriófagos e a sua utilização para o desenvolvimento de produtos comerciais, pois possibilita a produção de suspensões concentradas.

Todos os bacteriófagos selecionados apresentaram placas de lise claras (Figura 4). Conforme Jurczak-Kurek *et al.* (2016) a formação de placas de lise claras é típica de bacteriófagos líticos e a formação de placas turvas é indicativa de que o bacteriófago possua capacidade de entrar no ciclo lisogênico. Assim a opacidade das placas de lise é um importante critério para a seleção de bacteriófagos. A capacidade de entrarem no ciclo lisogênico não é desejada quando a finalidade do bacteriófago for para aplicações de controle do crescimento bacteriano.

Figura 4 – Aspectos e tamanhos das placas de lise dos bacteriófagos selecionados sobre as bactérias *P. fluorescens* hospedeiras após incubação



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

O diâmetro das placas de lise variaram entre $0,39 \pm 0,03$ e $2,67 \pm 0,20$ mm. Apenas o bacteriófago Ph32 apresentou placas de lise com diâmetro maior que 2 mm, diferindo significativamente dos demais ($p < 0,05$). Em estudos feitos com

bacteriófagos isolados para *P. fluorescens* o tamanho das placas de lise variaram de 1 a 7,4 mm (DINKAR *et al.*, 2017; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012). Nos estudos feitos com *P. aeruginosa* a variação das placas de lise foi menor sendo de 1 a 3 mm (AHIWALE *et al.*, 2012; DANIS-WLODARCZYK *et al.*, 2015; JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016).

As diferenças do tamanho das placas de lise indicam a diversidade de bacteriófagos, pois é uma característica individual. Jurczak-Kurek *et al.* (2016) em seu estudo encontraram uma correlação do tamanho da placa de lise com o tamanho da cabeça do bacteriófago. Os bacteriófagos com cabeças maiores formaram placas de lise menores. Segundo o autor esse fato pode estar correlacionado com a maior dificuldade dos bacteriófagos com cabeças grandes se difundirem pelo meio de cultivo sólido.

Abedon e Culler (2007) relacionaram o tamanho da placa de lise com períodos de latência e *burst size* dos bacteriófagos. Bacteriófagos com períodos latentes curtos produzem placas de lise maiores em relação aos bacteriófagos com períodos latentes longos. O mesmo acontece com o *burst size*, quanto menor o *burst size* maior o tamanho da placa de lise e vice-versa. Ainda segundo esses autores, os bacteriófagos com períodos latentes curtos têm mais tempo para se difundir pelo meio de cultivo sólido e infectar mais células bacterianas, aumentando o tamanho da placa de lise.

Em relação à especificidade de infecção dos bacteriófagos, foram avaliadas 20 estirpes bacterianas (Tabela 1) além das estirpes *P. fluorescens* utilizadas como hospedeiro para o isolamento. Os bacteriófagos Ph4, Ph6 e Ph29 não demonstraram capacidade de infectar outras estirpes bacterianas que não a estirpe hospedeira. Já os bacteriófagos Ph31, Ph41 e Ph45 apresentaram atividade lítica sobre *P. putida* ATCC 15175 com alta eficiência de infecção (EOP > 0,50). A especificidade de bacteriófagos de *Pseudomonas* spp. é bastante variável. Em alguns estudos os bacteriófagos isolados mostraram-se extremamente hospedeiro-específico, não infectando nenhuma outra estirpe bacteriana testada (AHIWALE *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012; TANAKA *et al.*, 2018). Em contrapartida, em outros estudos os bacteriófagos isolados não se mostraram hospedeiro-específico, atuando sobre outras estirpes bacterianas, mas pertencentes ao mesmo gênero (KWIA TEK *et al.*, 2015; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2012; SILLANKORVA *et al.*, 2008). No estudo

de Sillankorva *et al.* (2008) um dos bacteriófagos isolados foi capaz de infectar 11 estirpes de *P. fluorescens* testadas.

O bacteriófago Ph32 formou placas de lises opacas para *Listeria innocua* ATCC 33090 e *P. aeruginosa* INCQS 00313, bem como, os bacteriófagos Ph41 e Ph45 para a estirpe *P. fluorescens* UFV 041, somente a partir das suspensões não diluídas. A formação de um halo opaco apenas na região de inoculação de suspensão de bacteriófago não diluída sem a produção de placas de lises nos pontos de inoculação da suspensão diluída (10^{-1} a 10^{-7}) é indicativo de “lise de fora”, fato que pode ter ocorrido com esses três bacteriófagos.

A “lise de fora” ocorre quando as proteínas (holinas e endolisinas) responsáveis pela ruptura da parede celular das bactérias no final do processo da infecção fágica atuam sobre a parte externa da parede celular, degradando-a e levando a célula bacteriana à ruptura. No processo de formação da “lise de fora” não ocorre a infecção fágica, as proteínas encontram-se no meio e são oriundas de infecções anteriores (PUJATO *et al.*, 2018).

Um importante resultado dos testes de especificidade é que nenhum dos bacteriófagos estudados foi capaz de lisar estirpes bacterianas usadas nos processos tecnológicos de beneficiamento do leite para a produção de derivados. Esse fato sugere que sua aplicação como alternativa para conservação do leite cru seja segura, mesmo que sobrevivam aos tratamentos térmicos que antecedem o beneficiamento do leite. Em estudos feitos por Hu, Meng e Liu (2016) e por Tanaka *et al.* (2018) sobre avaliação da capacidade de bacteriófagos no controle de *Pseudomonas* spp. em leite, não foi avaliada a capacidade de bacteriófagos em infectar estirpes bacterianas utilizadas em processos tecnológicos de beneficiamento do leite.

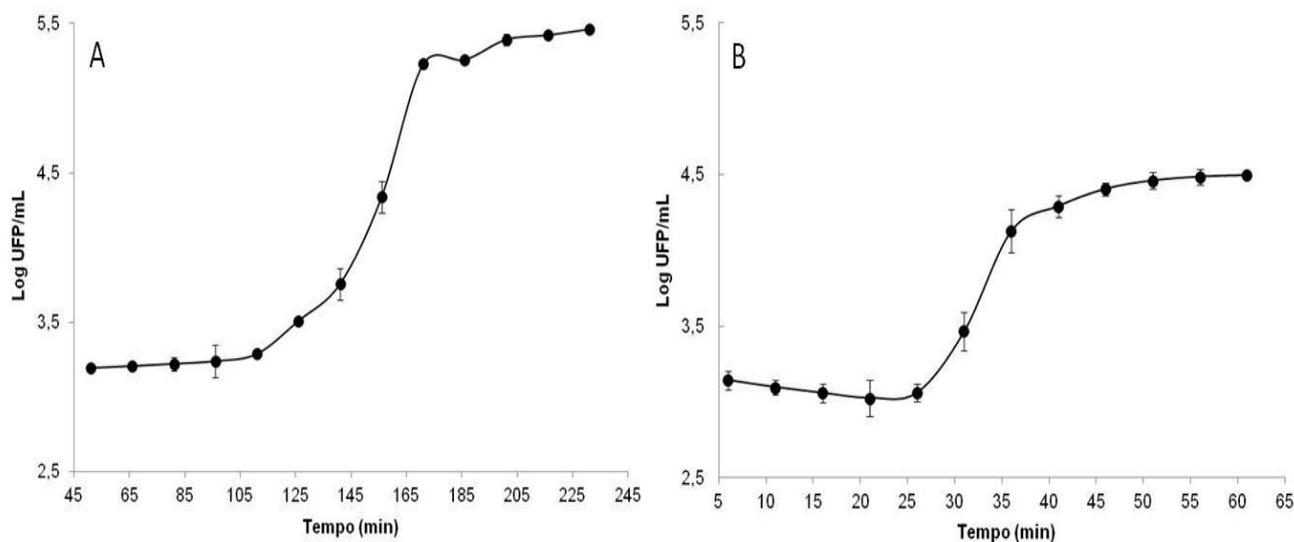
A partir dessa caracterização preliminar foram selecionados dois bacteriófagos para avaliação da curva de *one-step growth*, determinação do tamanho do genoma, resistências ao tratamento térmico, ao sanitizante e a diferentes faixas de pH. Os bacteriófagos selecionados foram Ph6 e Ph32, hospedeiros da estirpe *P. fluorescens* UFV 041. Os critérios para a seleção desses bacteriófagos foram: bactéria hospedeira com maior atividade proteolítica em estudos preliminares (MARTINS *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2014), maiores titulações e placas de lises em comparação com outros bacteriófagos.

5.2.2 *One-step growth*, tamanho de genoma, resistência ao tratamento térmico, ao sanitizante e pH

A caracterização do crescimento (*one-step growth*) dos bacteriófagos permite identificar as fases do processo de infecção, que incluem o período de latência e *burst size*. O período de latência é o tempo decorrido entre a infecção fágica e a liberação de progênie e o *burst size* refere-se ao número de partículas fágicas da progênie liberadas por célula infectada (TANAKA *et al.*, 2018).

O bacteriófago Ph6 apresentou período de latência de 96 minutos e *burst size* de 295 partículas fágicas por célula infectada (Figura 5A). Já o bacteriófago Ph32 apresentou período de latência de 25 minutos e *burst size* de 40 partículas fágicas por célula infectada (Figura 5B).

Figura 5 – Curvas *One-step Growth* dos bacteriófagos Ph6 (A) e Ph32 (B) em *P. fluorescens* UFV 041 em incubação a 30 °C. Valores médios (n=3) ± erro padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Em relação ao período de latência, existe uma grande variação nos valores encontrados nos estudos na literatura. Alguns autores relataram valores bastante curtos, variando entre 15 e 35 minutos, como o encontrado para o bacteriófago Ph32 (AHIWALE *et al.*, 2012; DANIS-WLODARCZYK *et al.*, 2015; DINKAR *et al.*, 2017; SILLANKORVA *et al.*, 2008). Enquanto que períodos de latência de 90 e 105 minutos, semelhantes ao observado para o bacteriófago Ph6, foram obtidos por outros autores (SUN *et al.*, 2012; TANAKA *et al.*, 2018). Quanto maior o período de

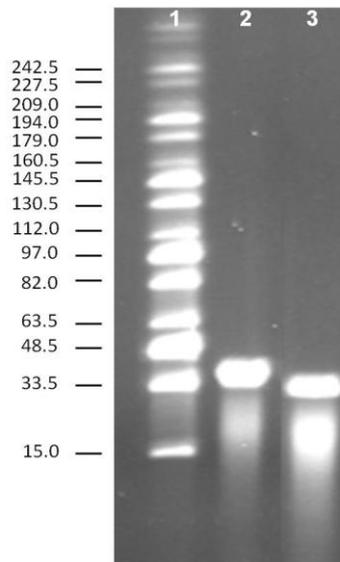
latência, maior o tempo gasto pelo bacteriófago para infectar a bactéria hospedeira e para liberar sua progênie (maturação), ou seja, levará mais tempo para eliminar a bactéria hospedeira.

O *burst size* apresentado pelo bacteriófago Ph6 é maior do que os valores observados na literatura, que variam entre 44 e 153 partículas fágicas por célula infectada (AHIWALE *et al.*, 2012; DANIS-WLODARCZYK *et al.*, 2015; DINKAR *et al.*, 2017; SILLANKORVA *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2012; TANAKA *et al.*, 2018). Já o Ph32 apresenta *burst size* semelhante ao do bacteriófago de *P. aeruginosa* descrito por Ahiwale *et al.* (2012), que foi de 44 partículas fágicas por célula infectada.

Segundo Sun *et al.* (2012) o período de latência apresentado pelo bacteriófago relaciona-se com o *burst size* de forma progressiva. Maiores períodos de latência levam a maiores *burst size*, fato que pode ser observado nos bacteriófagos estudados. Segundo Abedon e Culler (2007), bacteriófagos com período de latência maiores terão maiores *burst size* porque a progênie terá mais tempo disponível para sua maturação. Sun *et al.* (2012) também destacaram que esses parâmetros podem ser influenciados pelo hospedeiro (fase de crescimento), temperatura de incubação e pela taxa de crescimento específica de cada vírus, o que pode justificar a grande variação desses parâmetros. Segundo Jończyk-Matysiak *et al.* (2019), bacteriófagos que possuam grandes *burst size* e períodos curtos de latência devem ser preferencialmente utilizados para controle biológico. No caso do presente estudo, o uso associado dos dois bacteriófagos selecionados seria uma estratégia para atender a ambos os critérios.

O tamanho do genoma de bacteriófagos de *P. fluorescens* descritos na literatura varia entre 20 e 53 kbp (DINKAR *et al.*, 2017; SILLANKORVA *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2012). No presente estudo, o bacteriófago Ph6 apresentou tamanho de genoma ligeiramente superior (38,8 kb) ao do bacteriófago Ph32 (31,3 kb) (Figura 6). Genomas menores são mais interessantes para bacteriófagos com aplicações em biocontrole, uma vez que, podem ser clonados com maior facilidade e apresentam menor probabilidade de transferirem ilhas de patogenicidade das bactérias.

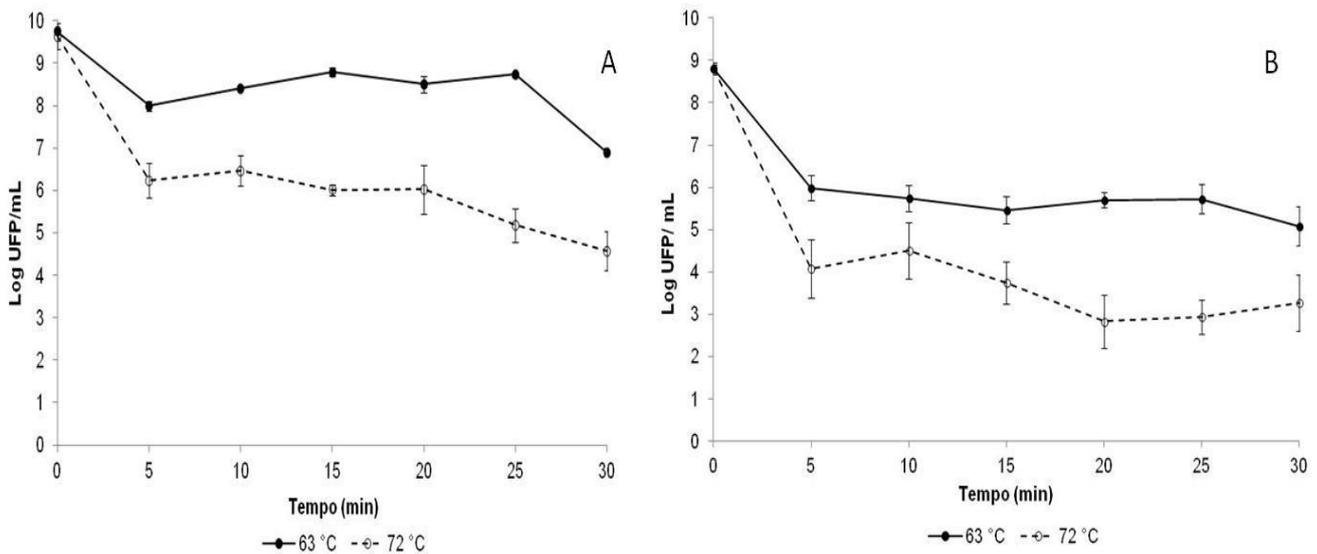
Figura 6 – Eletroforese de campo pulsado (PFGE) do DNA dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 não digeridos. 1 – marcador MidRange PFG Marker N0342S BioLabs; 2 – DNA não digerido do bacteriófago Ph6; 3 – DNA não digerido do bacteriófago Ph32.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Em relação à inativação térmica foram observadas reduções de aproximadamente 3 e 5 Log UFP/mL nas titulações do bacteriófago Ph6 após 30 min de tratamento a 63 e 72 °C, respectivamente (Figura 7A). A redução da titulação do Ph32 foi de 3,7 e 5,5 Log UFP/mL após 30 min de tratamento a 63 e 72 °C, respectivamente (Figura 7B). Nenhum dos dois bacteriófagos foi reduzido abaixo do limite de quantificação (<1,7 Log UFP/mL) nos binômios tempo/temperatura avaliados. O bacteriófago Ph6 mostrou-se mais resistente em ambos os binômios tempo/temperatura em comparação com o Ph32.

Figura 7 – Cinética de inativação térmica dos bacteriófagos Ph6 (A) e Ph32 (B) a 63 e 72 °C durante 30 min. Valores médios (n=3) ± erro padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Em estudo realizado por Sun *et al.* (2012) a estabilidade térmica de bacteriófago de *P. fluorescens* foi similar aos resultados obtidos neste estudo. Após 60 min de tratamento térmico a 70 °C, esses autores observaram redução 6,2 Log na titulação do bacteriófago analisado. Por outro lado, Danis-Wlodarczyk *et al.* (2015) não observaram nenhuma redução na titulação de bacteriófagos de *P. aeruginosa* em tratamentos térmicos nas temperaturas entre 40 e 70 °C por 60 min. Em contrapartida, Dinkar *et al.* (2017) observaram inativação de quatro bacteriófagos de *P. fluorescens* abaixo do limite de quantificação, após tratamento térmico a 45 °C por 30 min. A estabilidade térmica dos bacteriófagos é bastante variável. De acordo com Caldeira e Peabody (2007) essa variação pode estar relacionada ao número de ligações de dissulfeto presentes entre as proteínas do capsídeo dos bacteriófagos. Em seu estudo, esses autores verificaram redução da estabilidade térmica dos bacteriófagos após a adição de uma substância que destrói as ligações de dissulfeto.

A capacidade dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 de resistir aos tratamentos térmicos com os binômios tempo/temperatura comuns ao processamento do leite é uma característica positiva. A aplicação desses bacteriófagos para o biocontrole de *P. fluorescens* no leite cru permitiria a sua atuação contínua no leite tratado termicamente, auxiliando no controle de recontaminações.

A estabilidade dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 ao hipoclorito de sódio (NaClO) foi avaliada nas concentrações de 50 e 200 mg/L de cloro residual livre (CRL) por 30 min (Tabela 4). O bacteriófago Ph6 apresentou redução > 7,88 Log UFP/mL para os tratamentos com hipoclorito em ambas as concentrações. O Ph32 apresentou redução > 7,32 Log UFP/mL quando tratado com solução de hipoclorito a 200 mg/L e de 6,58 quando tratado com solução de hipoclorito a 50 mg/L.

Ambos os bacteriófagos mostraram-se sensíveis ao CRL, mas o Ph6 foi mais sensível. Em outros estudos também foi constatado que os compostos clorados apresentam eficácia para a inativação de bacteriófagos e que quanto maior a concentração de CRL, maior a eficácia, além de apresentarem melhor desempenho se comparado a outros sanitizantes (CHEN *et al.*, 2018; MERCANTI *et al.*, 2012; TOMAT *et al.*, 2017).

Tabela 4 – Titulação dos bacteriófagos antes e após tratamento com hipoclorito de sódio (NaClO) durante 30 min. Valores médios (n=3) ± desvio padrão.

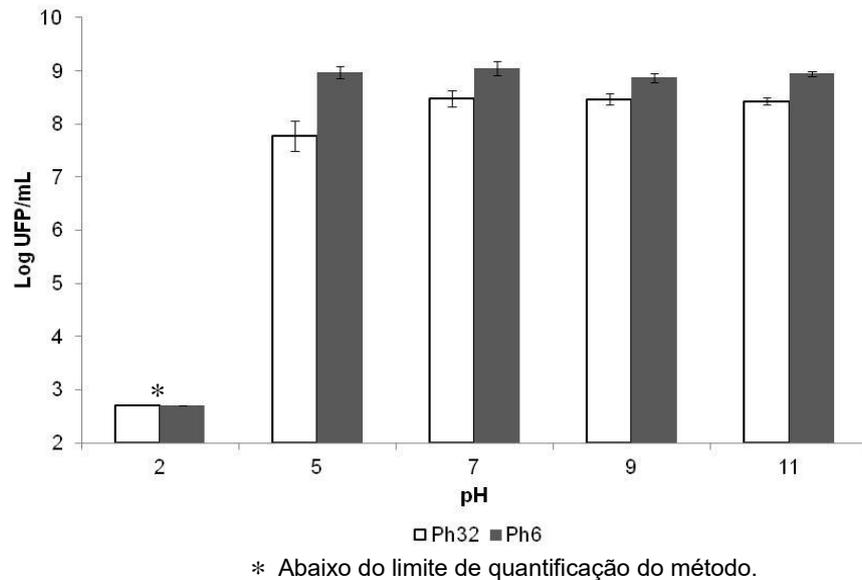
Bacteriófago	Titulação inicial (Log UFP/mL)	Titulação após o	
		tratamento a 200 mg/L (Log UFP/mL)	tratamento a 50 mg/L (Log UFP/mL)
Ph6	9,58 ± 0,06	< 1,70	< 1,70
Ph32	9,02 ± 0,25	< 1,70	2,44 ± 0,24

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

O efeito do pH na estabilidade dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 foi similar para o pH 2, no qual ambos apresentaram titulação < 50 UFP/mL (limite de quantificação), evidenciando que condições ácidas extremas levam ambos os bacteriófagos à inativação. Já nos valores de pH 5, 7, 9 e 11 os bacteriófagos mantiveram a sua titulação estável após o período de exposição de 60 min (Figura 8). Os bacteriófagos Ph6 e Ph32 apresentaram maior estabilidade às faixas extremas de pH alcalino, se comparados a outros bacteriófagos de *P. fluorescens* descritos na literatura. Em estudo feito por Dinkar *et al.* (2017) os bacteriófagos de *P. fluorescens* estudados foram inativados no pH 10. Da mesma forma, Sun *et al.* (2012) observaram inativação do bacteriófago KSL-1 de *P. fluorescens* em pH 11. Segundo Jończyk *et al.* (2011) a concentração de íons hidrogênio influencia na agregação (precipitação) dos bacteriófagos, o que limita a sua atividade. O processo de agregação (precipitação) limita a atividade do bacteriófago. Quando o valor de pH do meio é

menor ou igual ao ponto isoelétrico do bacteriófago há a formação de agregados, causando um declínio na titulação de bacteriófagos.

Figura 8 – Efeito do pH na estabilidade dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 após incubação em solução com pH ajustado para 2, 5, 7, 9 e 11 durante 60 min. Valores médios (n=3) ± erro padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

5.3 EFEITO DA ADIÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS SOBRE A CONTAGEM BACTERIANA, ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E PROTEÓLISE CAUSADA POR *P. fluorescens*

O controle do crescimento microbiano pelos bacteriófagos foi avaliado a 4 e 10 °C para simular condições adequadas de conservação e de abuso de temperatura de armazenamento do leite cru, respectivamente. Os bacteriófagos Ph6 e Ph32 alteraram a cinética de crescimento de *P. fluorescens* UFV 041 em meio de cultivo a base de leite em ambas as temperaturas avaliadas, reduzindo a contagem bacteriana na maioria dos tempos durante os 7 dias de armazenamento (Figura 9). No armazenamento a 4°C, as contagens de *P. fluorescens* UFV 041 nas amostras sem adição dos bacteriófagos começaram a aumentar progressivamente desde o primeiro dia de incubação e atingiram valores de $9,6 \pm 0,4$ Log UFC/mL após 7 dias. Mesmo nas condições ideais de temperatura preconizadas pela IN 76/2018, observou-se crescimento exponencial da bactéria, o que indica que a refrigeração

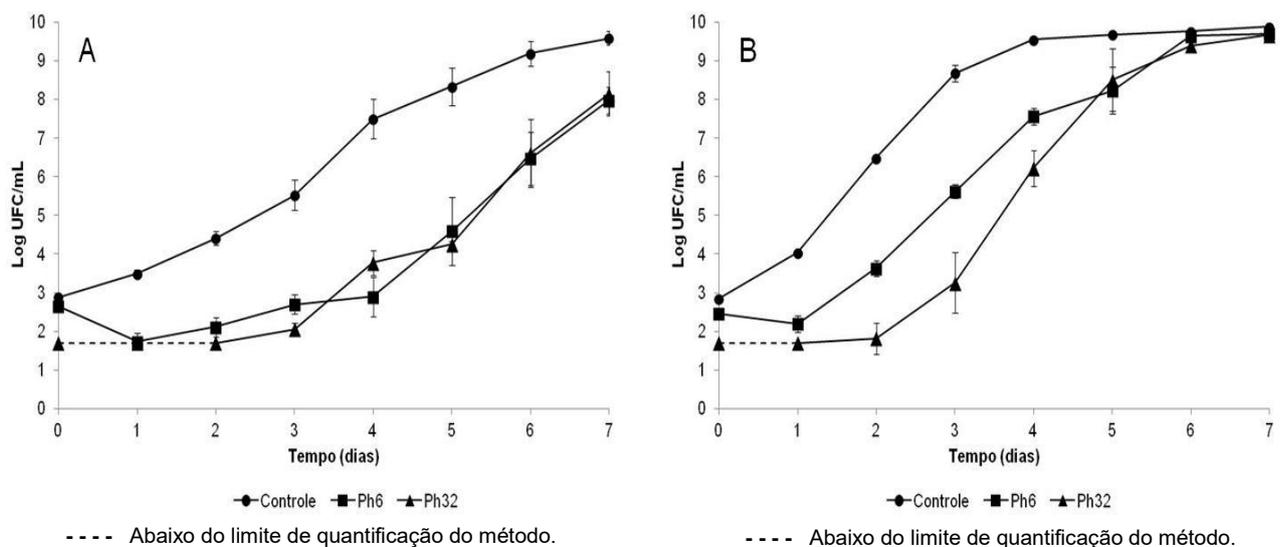
não é suficiente para resolver o problema. Nos tratamentos com os bacteriófagos Ph6 e Ph32 foram observadas reduções nas contagens de *P. fluorescens* UFV 041 variando de 1,6 (7º dia) a 4,6 (4º dia) Log UFC/mL e de 1,4 (7º dia) a 4,1 (5º dia) Log UFC/mL, respectivamente, ao longo de 1 a 7 dias de armazenamento (Figura 9A). Já no armazenamento a 10 °C, como esperado, a taxa de crescimento bacteriano foi maior e *P. fluorescens* UFV 041 atingiu a fase estacionária de crescimento em 4 dias com contagem média de $9,6 \pm 0,1$ Log UFC/mL nas amostras sem adição dos bacteriófagos. Nos tratamentos com os bacteriófagos Ph6 e Ph32 foram observadas reduções nas contagens de *P. fluorescens* UFV 041 variando de 0,1 (6º dia) a 3,1 (3º dia) Log UFC/mL e de 0,2 (7º dia) a 5,4 (3º dia) Log UFC/mL, respectivamente, ao longo de 1 a 7 dias de armazenamento (Figura 9B). Em estudo feito por Tanaka *et al.* (2018), sobre o potencial de bacteriófagos na redução da contagem de *P. lactis* em temperaturas de refrigeração, foi verificada uma redução de 2 e 3 Log UFC/mL na contagem de *P. lactis* incubada a 3 °C após 24 h e 4 dias de incubação, respectivamente.

Os resultados do presente estudo mostraram que ambos os bacteriófagos possuem atividade na temperatura de armazenamento refrigerado do leite cru. Entretanto, o bacteriófago Ph6 apresentou menor capacidade de redução de *P. fluorescens* UFV 041 na temperatura de incubação de 10 °C se comparado com o bacteriófago Ph32. Hu, Meng e Liu (2016) observaram diferença na infectividade de bacteriófagos de *Pseudomonas* spp. em função da temperatura de incubação. Dos treze bacteriófagos avaliados por esses autores apenas cinco apresentaram alta infectividade na temperatura de 4 °C. Segundo Jończyk *et al.* (2011) a temperatura é um fator crucial para a sobrevivência dos bacteriófagos e influencia diretamente na capacidade de infecção dos mesmos. A temperatura desempenha um papel fundamental na adsorção, penetração, multiplicação e na duração do período de latência. Em temperaturas abaixo da temperatura ótima para um determinado bacteriófago menos material genético penetra nas células hospedeiras bacterianas, reduzindo a sua infectividade.

Outro fator importante na infectividade de bacteriófagos é a fase de crescimento da bactéria hospedeira. As menores reduções de contagem bacteriana causada pelos bacteriófagos do presente estudo ocorreram na fase estacionária do cultivo microbiano, entre 6 e 7 dias de armazenamento, em ambas as temperaturas. Em estudo feito por Nabergoj, Modic e Podgornik (2017) verificou-se aumento do

período de latência e redução do *burst size* de bacteriófagos em cultivos bacterianos na fase estacionária. Segundo esses autores, as células bacterianas na fase estacionária entram em um modo "hibernação", um estado inativo persistente, mas reversível. Nesse modo "hibernação" as células infectadas produzem algumas enzimas fágicas, mas interrompem o desenvolvimento dos bacteriófagos até que os nutrientes adequados se tornem disponíveis. Além disso, alterações na membrana da bactéria durante a fase estacionária reduzem a adsorção dos bacteriófagos e, conseqüentemente, a sua infectividade.

Figura 9 – Cinéticas de crescimento de *P. fluorescens* UFV 041 com e sem adição de bacteriófagos nas temperaturas de 4 e 10 °C. A – *P. fluorescens* UFV 041 com e sem adição dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 a 4 °C. B – *P. fluorescens* UFV 041 com e sem adição dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 a 10 °C. Valores médios (n=3) ± erro padrão.

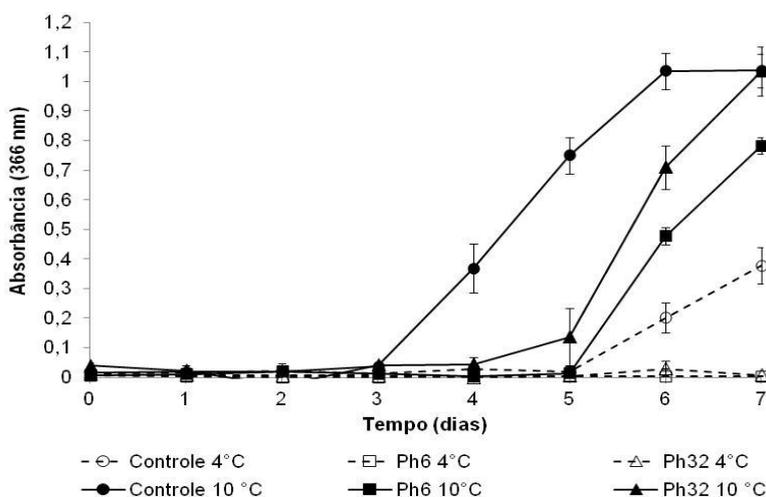


Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

A atividade proteolítica de *P. fluorescens* UFV 041 em meio de cultivo à base de leite nas amostras sem adição dos bacteriófagos, como esperado, foi maior e mais rápida a 10 °C do que a 4 °C, possivelmente devido à influência da temperatura na taxa de crescimento da bactéria. Os bacteriófagos Ph6 e Ph32 inibiram ou atrasaram em pelo menos dois dias a atividade proteolítica causada pela bactéria durante os armazenamentos a 4 e 10 °C, respectivamente (Figura 10). Esses resultados demonstram que além de reduzir as contagens bacterianas, os

bacteriófagos também têm efeito sobre a produção e/ou atividade de proteases produzidas por *P. fluorescens* UFV 041 mesmo em condições de abuso de temperatura. A presença dessas enzimas no leite cru leva a uma série de alterações dessa matéria-prima e seus derivados, como a formação de uma estrutura de gel, amargor, sabores maltados ou metálicos, sínereze em leites fermentados, sedimentação em UHT e perda de rendimento na fabricação de queijos (CHEN *et al.*, 2003; GLÜCK *et al.*, 2016; MATEÓS *et al.*, 2015; SAMARŽIJA *et al.*, 2012; STOECKEL *et al.*, 2016b). A redução da atividade proteolítica evidencia que o emprego desses agentes no leite cru pode evitar a degradação dos seus constituintes, preservando a sua qualidade ou prolongando o tempo de utilização dessa matéria-prima pela indústria sem prejuízos nos processos ou produtos finais.

Figura 10 – Atividade proteolítica de *P. fluorescens* UFV 041 em azocaseína com e sem adição dos bacteriófagos Ph6 e Ph32. Valores médios (n=3) ± erro padrão.

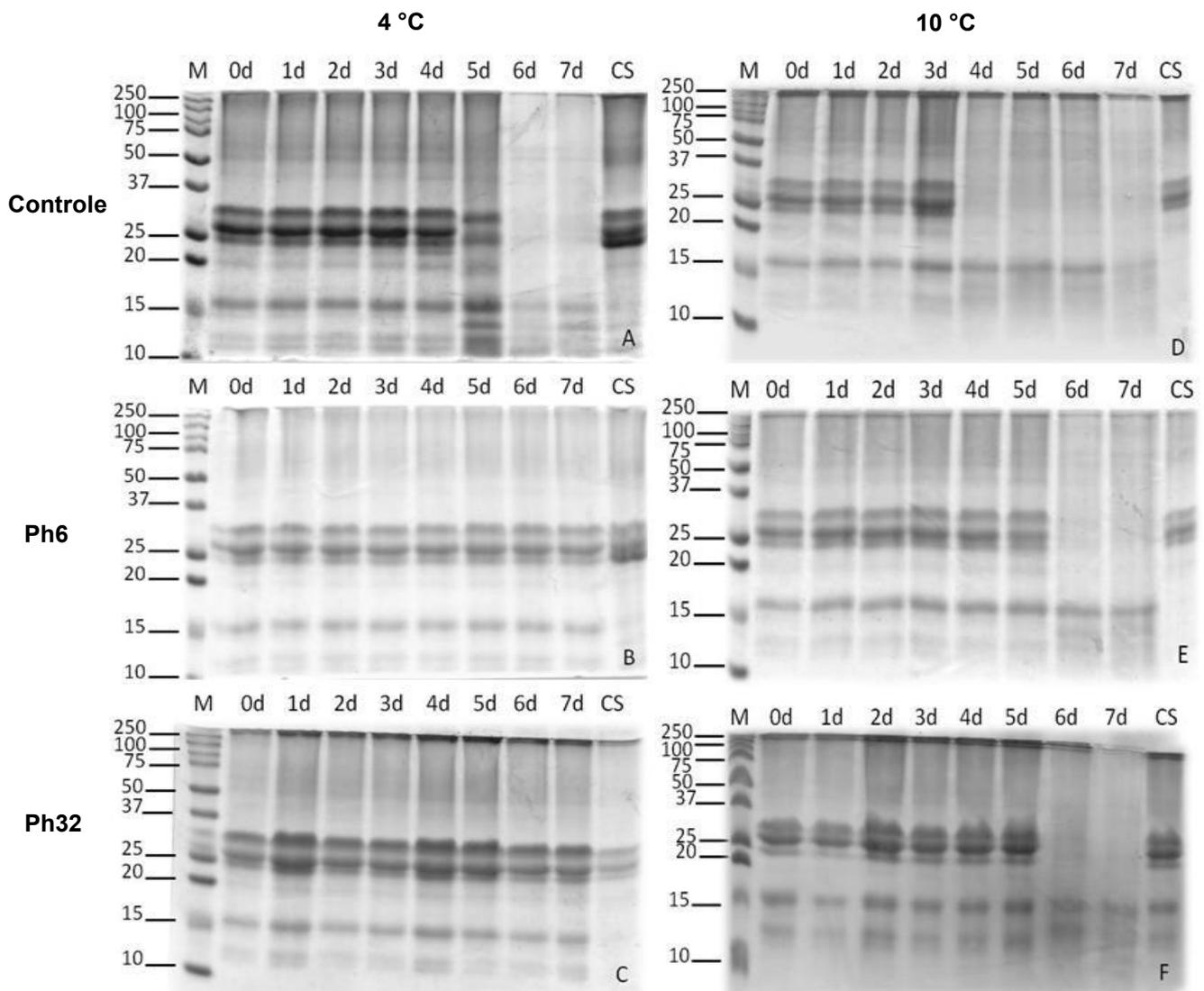


Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

A proteólise causada por *P. fluorescens* UFV 041 ocorreu a partir do sexto dia de incubação das amostras a 4 °C, com a degradação da molécula de caseína presente no meio de cultivo. Nas amostras tratadas com os bacteriófagos Ph6 e Ph32 não foi observada degradação de proteínas ao longo dos 7 dias de armazenamento, mostrando que ambos os bacteriófagos foram eficazes em evitar a degradação dos constituintes proteicos das amostras a 4 °C. Já nas amostras incubadas a 10 °C, sem adição de bacteriófagos, houve proteólise a partir do quarto dia de incubação. O tratamento com bacteriófagos atrasou a degradação de

proteínas em 48 h, a qual ocorreu a partir do sexto dia de armazenamento (Figura 11). Esses resultados são coerentes com aqueles obtidos nos ensaios de atividade proteolítica.

Figura 11 – SDS-PAGE (15%) das proteínas do meio líquido à base de leite e efeito dos bacteriófagos Ph6 e Ph32 na proteólise causada por *P. fluorescens* UFV 041 incubadas por 7 dias a 4 e 10 °C. A - *P. fluorescens* UFV 041 em meio à base de leite incubado a 4 °C. B - *P. fluorescens* UFV 041 em meio à base de leite adicionado de Ph6, incubado a 4 °C. C - *P. fluorescens* UFV 041 em meio à base de leite adicionado de Ph32, incubado a 4 °C. D - *P. fluorescens* UFV 041 em meio à base de leite incubado a 10 °C. E - *P. fluorescens* UFV 041 em meio à base de leite adicionado de Ph6, incubado a 10 °C. F - *P. fluorescens* UFV 041 em meio à base de leite adicionado de Ph32, incubado a 10 °C. M - *Precision Plus Protein™ Standards – BioRad*; 0d-7d – dias de incubação; CS – padrão de caseína.

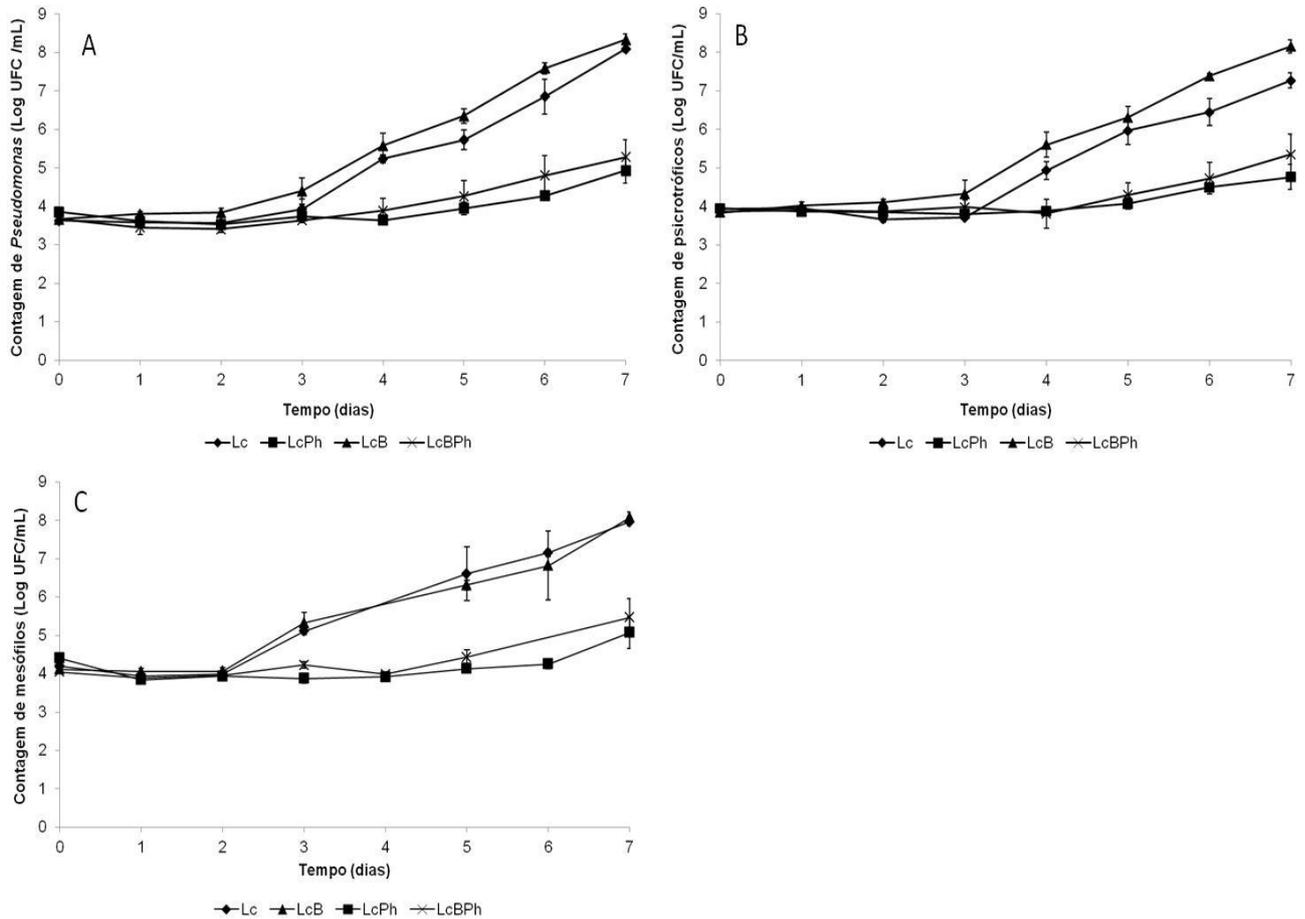


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

5.4 CONTROLE DE *Pseudomonas* spp., PSICROTRÓFICOS E MESÓFILOS EM LEITE CRU

As amostras de leite cru foram incubadas a 4 °C em conformidade com o estabelecido pela legislação brasileira. As contagens de *Pseudomonas* spp. nas amostras de leite cru atingiram valores de $8,1 \pm 0,2$ Log UFC/mL após 7 dias de incubação a 4 °C. As amostras de leite cru tratadas com os dois bacteriófagos selecionados apresentaram reduções nas contagens de *Pseudomonas* spp. variando de 0,03 (2° dia) a 3,2 (7° dia) Log UFC/mL, ao longo de 1 a 7 dias de armazenamento (Figura 12A). As reduções nas contagens de psicotróficos e mesófilos iniciaram-se a partir do 1° dia e variaram de 0,1 (1° dia) a 2,5 (7° dia) Log UFC/mL (Figura 12B) e de 0,04 (2° dia) a 2,9 (7° dia) Log UFC/mL (Figura 12C), respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para as amostras de leite cru artificialmente contaminado com *P. fluorescens* UFV 041 adicionadas ou não de bacteriófagos. As contagens de *Pseudomonas* spp. nas amostras de leite cru artificialmente contaminado com *P. fluorescens* UFV 041 atingiram valores de $8,3 \pm 0,2$ Log UFC/mL após 7 dias de incubação a 4 °C. As amostras adicionadas de *P. fluorescens* UFV 041 e tratadas com os dois bacteriófagos selecionados apresentaram reduções nas contagens de *Pseudomonas* spp. variando de 0,01 (1° dia) a 2,6 (7° dia) Log UFC/mL (Figura 12A). As reduções nas contagens de psicotróficos iniciaram-se a partir do 2° dia e variaram de 0,1 (2° dia) a 2,8 (7° dia) Log UFC/mL (Figura 12B) e de mesófilos iniciaram-se a partir do 1° dia e variaram de 0,1 (1° dia) a 2,6 (7° dia) Log UFC/mL (Figura 12C). Esses resultados mostram que os bacteriófagos foram ativos na matriz leite e que mesmo não tendo sido inoculada a bactéria hospedeira com qual os bacteriófagos foram isolados, eles tiveram atividade lítica sobre outros microrganismos presentes nas amostras de leite cru utilizada, reduzindo as contagens.

Figura 12 – Contagem de *Pseudomonas* spp. (A), psicotróficos (B) e mesófilos (C) em leite cru a 4 °C por 7 dias com e sem adição de coquetel de bacteriófagos. Valores médios (n=3) ± erro padrão.



Lc - leite cru; LcB - leite cru adicionado de *P. fluorescens* UFV 041 (10^3 UFC/mL); LcPh - leite cru adicionado de bacteriófagos Ph6 e Ph32 (10^7 UFP/mL); LcBPh - leite cru adicionado de *P. fluorescens* UFV 041 (10^3 UFC/mL) e de bacteriófagos Ph6 e Ph32 (10^7 UFP/mL).

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

As maiores reduções nas contagens microbianas no leite cru foram observadas após 7 dias de incubação, diferente do observado no experimento com o meio de cultivo à base de leite, no qual as maiores reduções foram observadas entre o terceiro e quinto dia para ambos os bacteriófagos. No experimento com o leite cru é possível observar uma cinética de crescimento das bactérias diferente da apresentada no experimento com o meio de cultivo à base de leite. No experimento com o leite cru as bactérias iniciam a fase de crescimento exponencial a partir do terceiro dia de incubação. Já no experimento com o meio de cultivo a base de leite

iniciam a fase de crescimento exponencial a partir do segundo dia. Segundo Nabergoj, Modic e Podgornik (2017) a concentração de bactérias influencia na infectividade dos bacteriófagos. Quando há baixas concentrações bacterianas a infectividade do bacteriófago é reduzida, pois há poucos hospedeiros e a possibilidade de colisão para adsorção é comprometida. Também segundo os autores, outros fatores podem influenciar na taxa de adsorção dos bacteriófagos, como diversidade bacteriana presente no meio, osmolaridade, força iônica e requisitos de eletrólitos (cátions divalentes como Mg^{2+} e Ca^{2+}).

Em estudo feito por Hu, Meng e Liu (2016) avaliando a eficácia de um coquetel de bacteriófagos em controlar *Pseudomonas* spp. em leite cru, após cinco dias de incubação a 4 °C observou-se a redução de 4 Log UFC/mL na contagem de psicrótrófos e mesófilos nas amostras inoculadas com o coquetel. No presente estudo a redução de psicrótrófos e mesófilos no quinto dia de incubação a 4 °C foi de 1,9 e 0,3 Log UFC/mL. A maior redução encontrada por Hu, Meng e Liu (2016) pode estar associada às diferenças experimentais, em seu estudo os autores utilizaram um coquetel de dez bacteriófagos e um MOI de 100.000.

Tanaka *et al.* (2018) observaram uma redução de 3 Log UFC/mL na contagem de *P. lactis* em amostras de leite integral adicionadas de bacteriófago após 4 dias de incubação. No presente estudo a redução de *Pseudomonas* spp. no quarto dia foi de 1,6 Log UFC/mL. A diferença entre os resultados pode ser devido ao fato de que no estudo feito por Tanaka *et al.* (2018) a única bactéria no leite era a *P. lactis* e a temperatura de incubação foi de 3 °C.

6 CONCLUSÃO

Foi possível o isolamento de bacteriófagos líticos para *P. fluorescens* de amostras de águas residuais. A caracterização quanto à titulação, tamanho de placas de lise e especificidade de microrganismos alvos permitiu a seleção de dois bacteriófagos líticos com características distintas desejáveis para aplicação em biocontrole no leite cru. Os dois bacteriófagos selecionados, Ph6 e Ph32, apresentaram período de latência e *burst size* complementares, genoma pequeno, estabilidade a uma ampla faixa de pH, e resistência térmica aos binômios tempo/temperatura utilizados pela indústria no tratamento térmico do leite. Eles reuniram várias características importantes para a sua utilização em biocontrole, destacando-se a estabilidade térmica, que possibilita sua atividade no controle de recontaminações bacterianas. Além disso, mostraram-se sensíveis à solução de hipoclorito de sódio na concentração usada nos processos industriais de desinfecção, o que permite sua eliminação quando desejável.

A eficácia na redução das contagens de *P. fluorescens* em meio de cultivo à base de leite, assim como a redução da atividade proteolítica e da degradação de proteínas nas temperaturas de armazenamento do leite cru demonstrou o potencial dos bacteriófagos estudados em retardar a perda da qualidade dessa matéria-prima. Com a aplicação dos bacteriófagos no leite cru verificou-se sua capacidade de reduzir as contagens de *Pseudomonas* spp., psicrotóxicos e mesófilos, que após sete dias de incubação foi de 3,2, 2,5 e 2,9 Log UFC/mL em amostras de leite cru e de 3, 2,8 e 2,6 Log UFC/mL em amostras de leite cru inoculadas com *P. fluorescens*, em relação às amostras não tratadas com o coquetel de bacteriófagos. Portanto, os bacteriófagos líticos, Ph6 e Ph32, isolados neste estudo são uma alternativa eficaz no auxílio do controle de *P. fluorescens* em leite cru e na manutenção da sua qualidade durante o período de estocagem refrigerada. A realização de testes em um maior número e diferentes amostras de leite, assim como a aplicação dos mesmos em escala e em condições reais de armazenamento do leite constituem estudos a serem feitos a fim de sedimentar a possibilidade da sua aplicação na cadeia leiteira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDON, S.T.; CULLER, R.R. Optimizing bacteriophage plaque fecundity. **Journal of Theoretical Biology**, v. 249, p.582–592, 2007.
- ADAMS, M.H. **Bacteriophages**. New York: Interscience, 1959. p. 450-451.
- AHIWALE, S.; PRAKASH, D.; GAJBHIYE, M.; JAGDALE, S.; PATIL, N.; KAPADNIS, B. BVPaP-3, a T7-like lytic phage of *Pseudomonas aeruginosa*: its isolation and characterization. **Current Microbiology**, v.64, p.305–311, 2012.
- ALVES, M.P.; SALGADO, R.L.; ELLER, M.R.; VIDIGAL, P.M.P.; CARVALHO, A.F. Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.10, p.7842-7851, 2016.
- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.
- ASLAM, S.; PRETORIUS, V.; ADLER, E.; LEHMAN, S.; MORALES, S.; GAIDAMAKA, A.; FURR, C.; ROSAS, F.; BISHOP-LILLY, K.; BISWAS, B.; SISSON, B.; FACKLER, J.; TRIGG, M.; SCHOOLEY, R. Novel bacteriophage therapy for treatment of ventricular assist device infections. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 38, n. 4, 2019.
- BAGLINIÈRE, F., TANGUY, G.; JARDIN, J.; MATÉOS, A.; BRIARD, V.; ROUSSEAU, F.; ROBERT, B.; BEAUCHER, E.; HUMBERT, G.; DARY, A.; GAILLARD, J.L.; AMIEL, C.; GAUCHERON, F. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2593–2603, 2012.
- BAGLINIÈRE, F.; MATÉOS, A.; TANGUY, G.; JARDIN, J.; BRIARD, V.; ROUSSEAU, F.; ROBERT, B.; BEAUCHER, E.; GAILLARD, J.L.; AMIEL, C.; HUMBERT, G.; DARY, A.; GAUCHERON, F. Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilization. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 2, p. 55-61, 2013.
- BAUR, C.; KREWINKEL, M.; KRANZ, B.; NEUBECK, M.V.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v.49, p. 23-29, 2015.
- BEVEN, C.A.; DIECKELMANN, M.; BEACHAM, D.I.R. A strain of *Pseudomonas fluorescens* with two lipase-encoding genes, one of which possibly encodes

cytoplasmic lipolytic activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p. 979-987, 2001.

BOULARES, M.; MANKAI, M.; HASSOUNA, M. Effect of thiocyanate and hydrogen peroxide on the keeping quality of ovine, bovine and caprine raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 52-56, 2011.

BRASIL, R.B.; SILVA, M.A.P.; CARVALHO, T.S.; CABRAL, J.F.; NICOLAU, E.S.; NEVES, R.B.S. Avaliação da qualidade do leite cru em função do tipo de ordenha e das condições de transporte e armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 389, p. 34-42, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 07, de 03 de maio de 2016. Dispõe sobre alteração do Art. 1º a tabela 2 o item 3.1.3.1 do Anexo II da Instrução Normativa nº 62 que aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 maio 2016. Seção 1, p. 11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 31, de 29 de Junho de 2018. Dispõe sobre alteração do Art. 1º a tabela 2 o item 3.1.3.1 do Anexo II da Instrução Normativa nº 62 que aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 julho 2018a. Seção 1, p. 03.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Dispõe sobre regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de nov. 2018b. Seção 1, p. 09.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Dispõe sobre os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de nov. 2018c. Seção 1, p. 10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.

BUENO, E.; GARCIA, P.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ, A. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.158, n.1, p.23–27, 2012.

CALDEIRA, J.C.; PEABODY, D.S. Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 5, p.1–10, 2007.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 255-275, 2003.

CHEN, X.; LIU, Y.; CHAI, S.; GUO, J.; WU, W. Inactivation of *Lactobacillus* virulent bacteriophage by thermal and chemical treatments. **Journal of Food Protection**, v.81, n.10, p.1673–1678, 2018.

CISEK, A.N.; DAŃBROWSKA, I.; GREGORCZYK, K.P.; WYŻEWSKI, Z. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. **Current Microbiology**, v.74, n.2, p. 277–283, 2017.

CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, C. A. F.; ZACARCHENCO, P. B.; CORASSIN, C. H. **Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados**. 1 ed. Elsevier, 304p. 2016.

DANIS-WLODARCZYK, K.; OLSZAK, T.; ARABSKI, M.; WASIK, S.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; AUGUSTYNIAK, D.; GULA, G.; BRIERS, Y.; JANG, H.B.; VANDENHEUVEL, D.; DUDA, K.A.; LAVIGNE, R.; DRULIS-KAWA, Z. Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1 -20, 2015.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 555–62, 2006.

DINKAR, N.; SHARMA, A.K.; NINAWA, A.S.; PRASAD, Y. Molecular characterization of lytic phages specific to antibiotic resistant isolates of *Pseudomonas fluorescens* infecting *Labeo rohita* and *Clarias batrachus* of Sub Himalayan region. **Journal of Environmental Biology**, v.38, n.2, p.353-360, 2017.

EL HADDAD, L.; JEAN-PIERRE ROY, J.P.; KHALIL, G.K.; ST-GELAIS, D.; CHAMPAGNE, C.P.; LABRIE, S.; MOINEAU, S. Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 7-13, 2016.

EWINGS, K. N.; O'CONNOR, R. E.; MITCHELL, G. E. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in south east Queensland. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 39, n. 2, p. 65-68, 1984.

FERNÁNDEZ, L.; ESCOBEDO, S.; GUTIÉRREZ, D.; PORTILLA, S.; MARTÍNEZ, B.; GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ, A. Bacteriophages in the dairy environment: from enemies to allies. **Antibiotics**, v. 6, n. 27, 2017.

FERREIRA, A.A.; MARQUES, K.A.; BARBOSA, J.B.; MARTINS, E.M.F.; PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L. Influência da atividade enzimática de *Pseudomonas*

fluorescens 041 em Labneh. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 385, p. 17-24, 2012.

GARCÍA, P.; MADERA, C.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, B.; SUÁREZ, J.E. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3019-3026, 2009.

GIRAFFA, G.; ZAGO, M.; DOMENICO, C. **Lactic acid bacteria bacteriophages in dairy products: problems and solutions**. In: Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities, Ed. Elsevier, 2017.

GLÜCK, C.; RENTSCHLER, E.; KREWINKEL, M.; MERZ, M.; NEUBECK, M.V.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. **International Dairy Journal**, v. 56, p.186-197, 2016.

GRATH, S. MC.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Bacteriophages in dairy products: pros and cons. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 450–455, 2007.

GRAWJEWSKI, B.A.; KUSEK, J.W.; GELFAND, H.M. Development of a bacteriophage typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Epidemiology and Infection**, v. 104, p. 403–414, 1985.

HAHNE, J.; ISELE, D.; BERNING, J.; LIPSKI, A. The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. **Food Microbiology**, p.1-34, 2018.

HENRICHS, S. C.; MACEDO, R. E. F.; KARAM, L. B. Influência de indicadores de qualidade sobre a composição química do leite e influência das estações do ano sobre esses parâmetros. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 12, n. 3, p. 199-208, 2014.

HU, Z.; MENG, X.C.; LIU, F. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk. **International Dairy Journal**, v. 55, p.72-78, 2016.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 44, p.1-51, 2016. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf. Acesso em: 18 dez. 2018.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 45, p.1-8, 2017. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf. Acesso em: 18 dez. 2018.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 46, p.1-8, 2018. Disponível em:

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_inf_rmativo.pdf. Acesso em: 08 jan. 2020.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

JENNES, S.; MERABISHVILI, M.; SOENTJENS, P.; PANG, K.W.; ROSE, T.; KEERSEBILCK, E.; SOETE, O.; FRANÇOIS, P.M.; TEODORESCU, S.; VERWEEN, G.; VERBEKEN, G.; VOS, D.; PIRNAY, J.P. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury—a case report. **Critical Care**, v.21, n.129, p.1-3, 2017.

JOŃCZYK, E.; KŁAK, M.; MIĘDZYBRODZKI, R.; GÓRSKI, A. The influence of external factors on bacteriophages—review. **Folia Microbiologica**, v.56, p.191–200, 2011.

JOŃCZYK-MATYSIAK, E.; ŁODEJ, N.; KULA, D.; OWCZAREK, B.; ORWAT, F.; MIĘDZYBRODZKI, R.; NEUBERG, J.; BAGIŃSKA, N.; WEBER-DĄBROWSKA, B.; GÓRSKI, A. Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 2019.

JURCZAK-KUREK, A.; GAŚSIOR, T.; NEJMAN-FALEŃCZYK, B.; BLOCH, S.; DYDECKA, A.; TOPKA, G.; NECEL, A.; JAKUBOWSKA-DEREDAS, M.; NARAJCZYK, M.; RICHERT, M.; MIESZKOWSKA, A.; WRÓBEL, B.; WĘGRZYN, G.; WĘGRZYN, A. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**, v.6, p.1-17, 2016.

KROPINSKI, A.M. Practical Advice on the One-Step Growth Curve. In: CLOKIE, M.R.J.; KROPINSKI, A.M.; LAVIGNE, R. **Bacteriophages: Methods and Protocols**. New York: Humana Press, 2018. Vol.3. p.41-47.

KWIATEK, M.; MIZAK, L.; PARASION, S.; GRYKO, R.; OLENDER, A.; NIEMCEWICZ, M. Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 7, p. 14, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.

LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; JACOBI, S.; WEISBILT, L.; BERNSTEIN, S.; MERIN, U. The influence of storage on the farm and in dairy silos on milk quality for cheese production. **International Dairy Journal**, v.18, p.109-113, 2008.

LINGOHR, E.; FROST, S.; JOHNSON, P.R. Determination of bacteriophage genome size by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Clokie, M. R. J.; Walker, J. M. (Ed.). **Bacteriophages Methods and Protocols**. Canadá: Humana Press, 2009. v.2, p. 19-25.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACHADO, S. G.; BAGLINIÈRE, F.; MARCHAND, S.; COILLIE, E.V.; VANETTI, M.C.D.; BLOCK, J.; HEYNDRIKX, M. The Biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 302, p. 1-22, 2017.

MAIA, G. B. S.; PINTO, A. R.; MARQUES, C. Y. T.; ROITMAN, F. B.; LYRA, D. D. Produção leiteira no Brasil. **Agropecuária: BNDES Setorial**, n. 37, p. 371-398, 2014.

MARCHAND, S.; VANDRIESCHE, G.; COOREVITS, A.; COUDIJZER, K.; JONGHE, V.; DEWETTINCK, K.; VOS, P.; DEVREESE, B.; HEYNDRIKX, M.; BLOCK, J. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, p.68–77, 2009.

MARTÍNEZ, B.; GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ, A. Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.56, p.1–6, 2019.

MARTINS, M.L.; PINTO, U.M.; RIEDEL, K.; VANETTI, M.C.D. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n.1, p.207-217, 2015.

MATÉOS, A.; GUYARD-NICODÈME, M.; BAGLINIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; DARY, A.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J.-L. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v.49, p.78-88, 2015.

MAZIERO, M. T.; VIANA, C.; BERSOT, L. S. Microrganismos psicrotóxicos lipolíticos em produtos lácteos durante o prazo comercial. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 65, n. 372, p. 10-17, 2010.

MENEZES, I. R.; ALMEIDA, A.C.; MORÃO, R.P.; REIS, S.V.; SANTOS, C.A.; LOPES, I.L.N. Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 58-63, 2015.

MERCANTI, D. J.; GUGLIELMOTTI, D.M.; PATRIGNANI, F.; REINHEIMER, J.A.; QUIBERONI, A. Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application. **Food Microbiology**, v. 29, p. 99-104, 2012.

MOHAMED, D. S.; AHMED, E.F.; MAHMOUD, A.M.; EL-BAKY, R.M.A.; JOHN, J. Isolation and evaluation of cocktail phages for the control of multi-drug resistant *Escherichia coli* serotype O104: H4 and *E. coli* O157: H7 isolates causing diarrhea. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, 2018.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; KÄKELÄ, R.; IBARRA, D.; YOUNI-IDRISSI, M.; ALATOSSAVA, T. Phospholipolysis caused by different types of bacterial phospholipases during cold storage of bovine raw milk is prevented by N₂ gas flushing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1307, p. 1-16, 2018.

MURPHY, J.; MAHONY, J.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. **Bacteriophages Infecting Lactic Acid Bacteria**. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Ed. Elsevier, p. 249-272, 2017.

NABERGOJ, D.; MODIC, P.; PODGORNIK, A. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. **MicrobiologyOpen**, p.1-10, 2017.

OLIVEIRA, G.B.; FAVARIN, L.; LUCHESE, R.H.; MCINTOSH, D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 313-321, 2015.

PALLERONI, N. *Pseudomonas*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, Online. 2005.

PERERA, M. N.; ABULADZE, T.; LI, M.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. **Food Microbiology**, v.52, p. 42-48, 2015.

PHAGEGUARD. PhageGuard Listex Application Data Sheet Cheese (2016). Disponível em: <https://www.phageguard.com/wp-content/uploads/2017/03/PhageGuard-Listex-Application-Data-Sheet-Cheese-Final.pdf>. Acesso em: 20 de fev. de 2019.

PINTO C. L. O; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S.G.; CARDOSO, R.R.; ALVES, R.M.; VANETTI, M.C.D. Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.4,n.2, p. 16-25, 2014.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S.G.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.70, n.2, p. 105-116, 2015.

PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT**. 2004. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PUJATO, S.A.; QUIBERONI, A.; MERCANTI, D.J. Bacteriophages on dairy foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p. 14-30, 2018.

QUIBERONI, A.; GUGLIELMOTTI, D.M; REINHEIMER, J. A. Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 51-62, 2003.

RADHAKRISHNAN, A.; ANANTHASUBRAMANIAN, M. Characterization and lytic activity of *Pseudomonas fluorescens* phages from sewage. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.356-362, 2012.

RHODES, M.E. (1959). Disponível em: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCTC+10038&collection=nctc>. Acesso em: 03 dez. 2019.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; OLIVEIRA, A.M.; SILVA, F.G.; TAMANINI, R.; OLIVEIRA, A.L.M.; BELOTI, V. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 75-83, 2018.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R. Produção brasileira de leite: uma análise conjuntural. Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. **Anuário Leite 2018. Embrapa Gado de Leite**. São Paulo, p. 6-8; 2018.

SADEKUZZAMAN, M.; YANG, S.; RAHAMAN MIZAN, M. D. F.; KIM, H.S.; HA, S.D. Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 78, p. 256-263, 2017.

SAMARŽIJA D.; ZAMBERLIN S.; POGAČIĆ T. Psychrotrophic bacteria and milk quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, 2001. 2368p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007.

SHIGEHISA, R.; UCHIYAMA, J.; KATO, S.I.; TAKEMURA-UCHIYAMA, I.; YAMAGUCHI, K.; MIYATA, R.; UJIHARA, T.; SAKAGUCHI, Y.; OKAMOTO, N.; SHIMAKURA, H.; DAIBATA, M.; SAKAGUCHI, M.; MATSUZAKI, S. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family *Podoviridae* genus N4-like viruses isolated in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 60, p. 64–67, 2016.

SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 80, 2008.

SILLANKORVA, S.; OLIVEIRA, H.; AZEREDO, J. Bacteriophages and their role in food safety. **International Journal of Microbiology**, p. 1-13, 2012.

SILVA, E.N.G.; FIGUEIREDO, A.C.L.; MIRANDA, F.A.; ALMEIDA, R.C.C. Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 11-16, 2014.

SITOHY, M.; MAHGOUB, S.; OSMAN, A. Controlling psychrotrophic bacteria in raw buffalo milk preserved at 4 °C with esterified legume proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1697-1702, 2011.

STOECKEL, M.; LIDOLT, M.; ACHBERGER, V.; GLÜCK, C.; KREWINKEL, M.; STRESSLER, T.; NEUBECK, V.M.; WENNING, M.; SCHERER, S.; FISCHER, L.; HINRICHS, J. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. **International Dairy Journal**, v. 59, p. 20-28, 2016b.

STOECKEL, M.; LIDOLT, M.; STRESSLER, T.; FISCHER, L.; WENNING, M.; HINRICHS, J. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 250-261, 2016a.

STONE, E.; CAMPBELL, K.; GRANT, I.; McAULIFFE, O. Understanding and Exploiting Phage–Host Interactions. **Viruses**, v.11, n.567, p.1-26, 2019.

SUN, W.J.; LIU, C.F.; YU, L.; CUI, F.J.; ZHOU, Q.; YU, S.L.; SUN, L. A novel bacteriophage KSL-1 of 2-Keto-gluconic acid producer *Pseudomonas fluorescens* K1005: isolation, characterization and its remedial action. **BMC Microbiology**, v.12, n.127, p.1-8, 2012.

TANAKA, C.; YAMADA, K.; TAKEUCHI, H.; INOKUCHI, Y.; KASHIWAGI, A.; TOBA, T. A lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.84, p.1-8, 2018.

TOMAT, D.; BALAGUÉ, C.; AQUILI, V.; VERDINI, R.; QUIBERONI, A. Resistance of phages lytic to pathogenic *Escherichia coli* to sanitisers used by the food industry and in home settings. **International Journal of Food Science and Technology**, p.1-7, 2017.

TOMAT, D.; CASABONNE, C.; AQUILI, V.; BALAGUÉ, C.; QUIBERONI, A. Evaluation of a novel cocktail of six lytic bacteriophages against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in broth, milk and meat. **Food Microbiology**, v. 76, p. 434-442, 2018.

VIANNA, P.C.B.; WALTER, E.H.M.; DIAS, M.E.F.; FARIA, J.A.F.; NETTO, F.M.; GIGANTE, M.L. Effect of addition of CO₂ to raw milk on quality of UHT-treated milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4256-4262, 2012.

VIAZIS, S.; AKHTAR, M.; FEIRTAG, J.; BRABBAN, A. D.; DIEZ-GONZALEZ, F. Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1323–1331, 2011.

VILELA, D.; RESENDE, J.C.; LEITE, J.B; ALVES, E. **A evolução do leite no Brasil em cinco décadas**. Revista de Política Agrícola. n. 1, p.5-24, 2017.

VITHANAGE, N. R. DISSANAYAKE, M; BOLGE, G.; PALOMBO, E.A.; YEAGER, T.R.; DATTA, N. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. **International Dairy Journal**, p. 1-35, 2016.

YOUNG, R. Phage lysis: do we have the hole story yet? **Current Opinion in Microbiology**, v.16, p.790–797, 2013.