

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**

**Felipe Gomes da Costa Oliveira**

**Avaliação da eficácia de bacteriófagos na redução de *Pseudomonas fluorescens* e seu efeito na vida de prateleira de queijo Minas Frescal**

Juiz de Fora  
2023

**Felipe Gomes da Costa Oliveira**

**Avaliação da eficácia de bacteriófagos na redução de *Pseudomonas fluorescens* e seu efeito na vida de prateleira de queijo Minas Frescal**

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

Orientador: Prof. Dr. Humberto Moreira Hungaro  
Coorientadores: Profa. Dra. Maryoris Elisa Soto Lopes e  
Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Anna

Juiz de Fora  
2023

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

Oliveira, Felipe Gomes da Costa.

Avaliação da eficácia de bacteriófagos na redução de *Pseudomonas fluorescens* e seu efeito na vida de prateleira de queijo Minas Frescal / Felipe Gomes da Costa Oliveira. -- 2023.  
76 f. : il.

Orientador: Humberto Moreira Húngaro

Coorientadores: Maryoris Elisa Soto Lopes, Anderson de Souza Sant'Anna

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, 2023.

1. Psicrotro?ficos. 2. Bacteriófagos. 3. Queijo fresco. 4. Biocontrole. I. Húngaro, Humberto Moreira, orient. II. Lopes, Maryoris Elisa Soto, coorient. III. Sant'Anna, Anderson de Souza, coorient. IV. Título.

**Felipe Gomes da Costa Oliveira**

**Avaliação da eficácia de bacteriófagos na redução de *Pseudomonas fluorescens* e seu efeito na vida de prateleira de queijo Minas Frescal**

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 à 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 14 de dezembro de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Maryoris Elisa Soto Lopez** - Coorientadora  
Universidad de Córdoba

**Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana** - Coorientador  
Universidade Estadual de Campinas

**Prof. Dr. Joao Batista Ribeiro**

Embrapa Gado de Leite

**Prof. Dr. Pedro Marcus Pereira Vidigal**  
Universidade Federal de Viçosa

**Prof. Dr. Felipe Alves de Almeida**  
EPAMIG/ILCT

Juiz de Fora, 19/12/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Moreira Hungaro, Professor(a)**, em 20/12/2023, às 09:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anderson de Souza Sant'Ana, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Batista Ribeiro, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Marcus Pereira Vidigal, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Alves de Almeida, Usuário Externo**, em 22/12/2023, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maryoris Elsa Soto Lopez, Usuário Externo**, em 15/01/2024, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1633098** e o código CRC **25320CBF**.

## RESUMO

O queijo Minas Frescal (QMF) é um dos queijos mais produzidos e consumidos no Brasil. Entretanto, esse tipo de queijo apresenta vida de prateleira curta devido à facilidade de contaminação microbiana durante o processo produtivo. A deterioração microbiana de QMF ocorre, principalmente, por crescimento de bactérias psicrotóricas, que podem crescer e produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas mesmo em temperaturas de 4°C. Neste sentido, o gênero *Pseudomonas* merece destaque devido a sua frequência de isolamento e problemas relacionados ao seu crescimento em leite e derivados. Esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade de bacteriófagos líticos no controle de *Pseudomonas fluorescens* artificialmente inoculada em queijo Minas Frescal a fim de reduzir a deterioração e ampliar a vida de prateleira deste produto lácteo. Foram utilizados dois bacteriófagos líticos (UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6) e uma estirpe de *P. fluorescens* (UFV 041) nos experimentos. Inicialmente, os fagos foram avaliados quanto à estabilidade em salmoura (23% de NaCl e pH 5,3) durante 28 dias. As titulações dos fagos UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6 permaneceram constantes ao longo do armazenamento da salmoura a 10°C: 7,0 e 4,0 Log UFP/mL, respectivamente. Em seguida, avaliou-se a influência da adição dos fagos na redução das contagens bacterianas em queijo. Foram preparados microqueijos inoculados com 10<sup>4</sup> UFC/mL de bactéria e adição combinada dos bacteriófagos UFJF\_PfSW6 (10<sup>6</sup> UFP/mL) e UFJF\_PfDIW6 (10<sup>9</sup> UFP/mL) via leite, massa ou salmoura. Observou-se diferenças estatísticas significativas (p<0,05) entre a contagem de bactérias em microqueijos adicionados ou não de bacteriófagos apenas aos 3 dias de armazenamento refrigerado. O tratamento com fagos reduziu em torno de 1,1 a 1,5 Log UFC/g nos microqueijos após esse período de armazenamento independente da forma de adição dos vírus. Entretanto, a eficiência dos fagos na redução bacteriana foi diminuindo ao longo do armazenamento, atingindo valores de 0,1 e 0,2 Log UFC/g aos 28 dias. Dessa forma, avaliou-se o efeito dos fagos na contagem de *P. fluorescens* adicionados via salmoura em queijos fabricados em macroescala, considerando diferentes cargas microbianas e temperaturas de armazenamento (10<sup>3</sup> UFC/g e 10 °C; 10<sup>3</sup> UFC/g e 4 °C; 10<sup>7</sup> UFC/g e 10 °C). Observou-se que *P. fluorescens* cresceu rapidamente nos queijos mesmo quando em baixa carga microbiana inicial e baixa temperatura de armazenamento, atingindo contagens acima de 10<sup>8</sup> UFC/g entre 7 e

14 dias. O tratamento com fagos apresentou baixa eficácia no controle de *P. fluorescens* em QMF produzido em macroescala, com exceção da condição experimental de inóculo de  $10^3$  UFC/g e 4 °C em que os fagos provocaram reduções > 1,0 Log UFC/g aos 3 dias de armazenamento. Entretanto, ao longo do período de armazenamento esse efeito foi reduzido. Portanto, a adição de fagos não foi capaz de reduzir de forma efetiva a contagem de *P. fluorescens* nos queijos e, conseqüentemente, não controlou a atividade proteolítica causada pela bactéria. As amostras de queijo contaminadas apresentaram uma rápida degradação de proteínas, demonstrada pela variação no índice de profundidade e extensão de 1,7 a 20,9% e 4,1 a 24,4%, respectivamente. A degradação de lipídeos também foi observada por meio do aumento da acidez titulável, com gasto acima de 2 mg KOH/g na neutralização da gordura ao final do armazenamento. Outro importante resultado desse estudo foi a capacidade de sobrevivência de *P. fluorescens* em salmoura. Apesar da redução na contagem inicialmente inoculada ao longo do tempo, contagens de 2,4 Log UFC/mL foram obtidas após 40 dias de armazenamento da salmoura a 10 °C. Os fagos também não foram capazes de reduzir a contagem bacteriana em salmoura. Portanto, os bacteriófagos estudados não foram eficazes no controle da deterioração do QMF por *P. fluorescens*, bem como, na redução dessa bactéria em salmoura, uma importante fonte de contaminação microbiana de queijos. Novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar as influências da matriz/alimento da interação bacteriófago-bactéria, influências do estado fisiológico da bactéria no processo de infecção, bem como, influência do NaCl a infectividade dos fagos utilizados nesse estudo. Indica-se também a avaliação da aplicação de bacteriófagos em outros derivados lácteos.

**Palavras-chave:** Psicrotrofos; Vírus; Queijo fresco; Biocontrole

## ABSTRACT

Minas Frescal cheese (QMF) is one of Brazil's most produced and consumed cheeses. However, this type of cheese has a short shelf life due to the ease of microbial contamination during production. Microbial deterioration of QMF occurs mainly through the growth of psychrotrophic bacteria, which can grow and produce proteolytic and lipolytic enzymes even at temperatures of 4°C. In this sense, the genus *Pseudomonas* deserves attention due to its isolation frequency and problems related to its growth in milk and dairy products. This study aimed to evaluate the activity of lytic bacteriophages in controlling *Pseudomonas fluorescens* in Minas Frescal cheese to reduce spoilage and extend the shelf life of this dairy product. The experiments used two lytic bacteriophages (UFJF\_PfDIW6 and UFJF\_PfSW6) and a strain of *P. fluorescens* (UFV 041). Initially, the phages were evaluated for brine stability (23% NaCl and pH 5.3) for 28 days. The titer of phages UFJF\_PfDIW6 and UFJF\_PfSW6 remained constant throughout storage, at 7,0 and 4,0 Log PFU/mL, respectively. Next, the influence of adding phages to cheese on the reduction of bacteria was evaluated. Microcheeses were prepared and inoculated with 10<sup>4</sup> CFU/mL of bacteria, and the bacteriophages UFJF\_PfSW6 (10<sup>6</sup> PFU/mL) and UFJF\_PfDIW6 (10<sup>9</sup> PFU/mL) via milk, dough, or brine. Statistically significant differences (p<0.05) were observed between the bacterial count in micro cheeses with or without bacteriophages added only after three days of refrigerated storage. Phage treatment reduced around 1,1 to 1,5 Log CFU/g in micro cheeses after this storage period, regardless of how the viruses were added. However, the efficiency of phages in bacterial reduction decreased throughout storage, reaching values of 0,1 and 0,2 Log CFU/g at 28 days. In this way, the effect of phages on the count of *P. fluorescens* added via brine to cheeses manufactured on was evaluated considering different microbial loads and storage temperatures (10<sup>3</sup> CFU/g and 10 °C; 10<sup>3</sup> CFU/g and 4 °C; 10<sup>7</sup> CFU /g and 10 °C). It was observed that *P. fluorescens* grew rapidly in cheeses even at low microbial loads and low storage temperatures, reaching counts above 10<sup>8</sup> CFU/g between 7 and 14 days. Phage treatment showed low efficacy in controlling *P. fluorescens* in QMF produced on a macro scale, except in the experimental condition of inoculum of 10<sup>3</sup> CFU/g and 4 °C in which the phages caused reductions > 1,0 Log CFU/g at 3 days of storage. However, over the storage period, this effect was reduced. Therefore, adding phages could not effectively reduce the *P. fluorescens* count in cheeses and,



consequently, did not interfere with the deterioration process. The extension and depth indices, which measure protein degradation, reached values above 20% after 28 days, regardless of the storage temperature and whether or not phages were added to the cheeses. Lipid degradation was also observed through increased titratable acidity, with over 2 mg KOH/g expenditure to neutralize fat at the end of storage. Another important result of this study was the survival capacity of *P. fluorescens* in brine. Despite the reduction in the initially inoculated count over time, counts of 2,4 Log CFU/mL were obtained after 40 days of storage at 10 °C. Phages were also unable to reduce bacterial counts in brine. Therefore, the bacteriophages studied were ineffective in controlling the deterioration of QMF by *P. fluorescens* and in reducing these bacteria in brine, an important source of cheese contamination. New studies must be carried out to elucidate the influences of the matrix/food on the bacteriophage-bacteria interaction, the influences of the physiological state of the bacteria on the infection process, and the influence of NaCl on the infectivity of the phages used in this study. It is also recommended to analyze the application of bacteriophages in other dairy products.

**Keywords:** Psychrotrophs; Phages; Viruses; Control

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal. ....	22
Figura 2: Análise bibliográfica de contaminação microbiana em queijo Minas Frescal no Brasil. ....	25
Figura 3: Esquema estrutural de um bacteriófago caudado. ....	32
Figura 4: Processo de infecção da bactéria por meio de ciclo lítico ou lisogênico. Adaptado de Feiner et al. (2015). ....	34
Figura 5: Esquema de produção do microqueijo com adição dos fagos UFJF_PfSW6 e UFJF_PfDIW6 em diferentes etapas do processo produtivo. ....	42
Figura 6 (A): Contagem de Pseudomonas ao longo de 28 dias de armazenamento em microqueijos adicionados de bacteriófagos em diferentes etapas do processo produtivo (leite, massa ou salga).....	50
Figura 7A: Contagem de Pseudomonas ao longo do tempo nas três condições de aplicação dos fagos (armazenamento a 10 °C e carga inicial alta; armazenamento a 10 °C e carga inicial baixa; armazenamento a 4 °C e carga inicial baixa). (B): Redução na contagem de Pseudomonas ao longo do tempo nas três condições de aplicação dos fagos. (C): Titulação de fagos ao longo do tempo nas três condições de aplicação. ....	53
Figura 8: Efeito dos fagos UFJF_PfDIW6 e UFJF_PfSW6 na redução de contagem de P. fluorescens UFV 041 em queijo minas frescal durante os 28 dias de armazenamento a 10 °C e carga inicial MOI alta (A, B e C), a e 10 °C e carga inicial MOI baixa (D, E e F) e a 4 °C e carga inicial baixa (G, H e I). Grau de lipólise medido em mg de KOH gastos para neutralizar um grama de gordura de queijo Minas Frescal. (*) = diferença estatística significativa. ....	55
Figura 9: Efeito do fago na contagem de P. fluorescens na salmoura refrigerada a 10°C durante os 40 dias de experimento. ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição média do queijo Minas Frescal. ....	21
Tabela 2: Padrões microbiológico e limites estabelecidos pela Portaria n°146/1996 (MAPA) e pela Instrução Normativa n°60/2019 (ANVISA) para queijo Minas Frescal .....	24
Tabela 3: Exemplos de contaminação microbiana em queijo Minas Frescal no Brasil e inconformidades segundo a Portaria n°146 -MAPA (07/03/1996) e Resolução RDC n° 331– ANVISA (23/12/2019). ....	26
Tabela 4: Exemplo de aplicação de fagos em diferentes tipos de queijo e características da aplicação .....	37
Tabela 5: Titulação de bacteriófagos adicionados em salmoura e armazenados a 10 °C durante 28 dias.....	46

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1. QUEIJO MINAS FRESCAL (QMF) .....	19
3.2. CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE QMF .....	23
3.3. PSEUDOMONAS EM QUEIJOS .....	29
3.4. BACTERIÓFAGOS NO CONTROLE MICROBIANO DE QUEIJOS .....	31
3.4.1. Ciclos de Infecção.....	33
3.5. APLICAÇÃO DE FAGOS EM QUEIJOS .....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1. MICRORGANISMOS .....	40
4.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE BACTERIÓFAGOS EM SALMOURA..	41
4.3. DETERMINAÇÃO DA ETAPA DE ADIÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS NO PROCESSO PRODUTIVO.....	41
4.4. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS BACTERIÓFAGOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL (LARGE-SCALE) .....	43
4.4.1. Fabricação do queijo Minas Frescal.....	43
4.4.2. Análise Microbiológica.....	44
4.4.3. Análise das frações de nitrogênio e determinação do grau de proteólise	44
4.5. SOBREVIVÊNCIA DE P. FLUORESCENS EM SALMOURA ADICIONADA OU NÃO DE BACTERIÓFAGOS.....	45
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.1. ESTABILIDADE DOS BACTERÍOFAGOS EM SALMOURA .....	<b>46</b>
5.2. DETERMINAÇÃO DA ETAPA DE ADIÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS NO PROCESSO PRODUTIVO.....	<b>48</b>
5.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS BACTERÍOFAGOS EM QUEIJO MINAS FRESAL AO LONGO DO ARMAZENAMENTO (LARGE-SCALE).....	<b>51</b>
5.3.1. Efeito dos bacteriófagos sobre a contagem bacteriana em queijo Minas Frescal .....	<b>51</b>
5.3.2. Influência da adição de bacteriófagos sobre a proteólise e a lipólise no queijo Minas Frescal .....	<b>54</b>
5.4. EFEITO DO FAGO NA CONTAMINAÇÃO DA SALMOURA .....	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Queijo Minas Frescal (QMF) é um dos principais queijos frescos produzidos no Brasil, tanto por grandes indústrias como por pequenas unidades familiares e artesanais. Características intrínsecas, como alto teor de água, pH e quantidade de nutrientes, bem como, as condições de processamento e armazenamento desse tipo de queijo favorecem a sua contaminação microbiana e o crescimento de patógenos e deteriorantes, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, e estirpes de *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, entre outros (FERREIRA; DOS SANTOS, 2022; LIMA; DIIRR; RAMOS; DE FÁTIMA ULISSES *et al.*, 2022; RIBEIRO; FREIRE; SILVEIRA; CARVALHO, 2023; VINHA; DE OLIVEIRA PINTO; CHAVES, 2018). O crescimento de bactérias do grupo coliformes e/ou de bactérias psicotróficas são as principais causas de deterioração microbiana de QMF. As bactérias do grupo coliformes podem fermentar a lactose, produzir gás e causar um defeito denominado de estufamento precoce em QMF (FARKYE, 2000; OKURA; MOACIR, 2010; TABLA; GÓMEZ; REBOLLO; MOLINA *et al.*, 2022). Por outro lado, o crescimento de bactérias psicotróficas pode levar a alterações sensoriais, de textura e cor no QMF, mesmo em condições adequadas de armazenamento refrigerado (GOULART; PINTO, 2021; MIRANDA, 2020).

O gênero *Pseudomonas* merece destaque dentre as bactérias psicotróficas deteriorantes de alimentos, devido a sua frequência de isolamento e problemas relacionados ao seu crescimento em leite e derivados. Essas bactérias são ubiqüitárias e facilmente destruídas no processamento térmico do leite empregado na indústria de laticínios. Entretanto, elas podem recontaminar as plantas produtivas e, conseqüentemente, os produtos lácteos no processamento por meio de matérias-primas, solo e água, e por falhas higiênicas (FERREIRA, 2017). As salmouras utilizadas na salga do queijo também podem abrigar microrganismos contaminantes provenientes de fontes ambientais ou de queijos contaminados (BROWN; MILLÁN-BORRERO; CARBONELLA; MICHELETTI *et al.*, 2018; MARINO; SEGAT; MAIFRENI; FRIGO *et al.*, 2015). Os principais problemas causados por *Pseudomonas* e suas enzimas hidrolíticas em lácteos estão relacionados com defeitos de sabor amargo, odor, cor e consistência indesejáveis no produto final, bem como, gelatinização de leite UHT, rancidez em manteiga, perda de rendimento em queijos e alteração nas características da textura (DA SILVA COSTA; DA SILVA RODRIGUES; DE

CARVALHO; MACHADO, 2022; DE ANDRADE PAULO; MONTANHINI; RIBEIRO, 2021).

O gênero *Pseudomonas* produz uma variedade de pigmentos fluorescentes e não fluorescentes e o surgimento de pigmentação azul em queijos é apontado pelo Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações da União Europeia (*Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF*) como um indicativo de contaminação por estirpes de *Pseudomonas fluorescens* (RASFF, 2010). Como consequência, diversos estudos foram desenvolvidos para caracterizar adequadamente a deterioração em queijos, visando a detecção e identificação dos seus agentes causadores. A pigmentação azul é frequentemente registrada em queijos, como muçarela (CARMINATI *et al.*, 2019; BARUZZI *et al.*, 2012) e queijo Minas Frescal (DE PAULA; MEDEIROS; FERNANDES; DA SILVA *et al.*, 2021; TEIDER; RIBEIRO; OSSUGUI; TAMANINI *et al.*, 2019).

A presença de *P. fluorescens* resulta em proteólise, descoloração e lipólise em queijos. Diversos trabalhos indicam problemas como amargor, odor desagradável e pigmentação em queijo muçarela (BARUZZI; LAGONIGRO; QUINTIERI; MOREA *et al.*, 2012; QUINTIERI; CAPUTO; DE ANGELIS; FANELLI, 2020; ROSSI; SERIO; CHAVES-LÓPEZ; ANNIBALLI *et al.*, 2018), , formação de sedimentos e modificação do tempo de coagulação do coalho e firmeza da coalhada em queijo Cheddar (LAW; ANDREWS; SHARPE, 1977; PALUDETTI; KELLY; GLEESON, 2020; SAMARŽIJA; ZAMBERLIN; POGAČIĆ, 2012), rancidez em queijo semi-duro maturado (CORSETTI; ROSSI; GOBBETTI, 2001) e pigmentação azul em queijo Minas Frescal (DA SILVA RODRIGUES; MACHADO; DE CARVALHO; NERO, 2021).

Algumas tecnologias podem ser utilizadas para ampliar a vida de prateleira de queijos, incluindo o uso de aditivos antimicrobianos de origem vegetal natural, atmosfera modificada ou embalagens ativas, revestimentos comestíveis, uso de fotossensibilizadores e de dióxido de carbono e altas pressões hidrostáticas (BARUKČIĆ; ŠČETAR; MARASOVIĆ; LISAK JAKOPOVIĆ *et al.*, 2020; CHRISTAKI; MOSCHAKIS; KYRIAKOUDI; BILIADERIS *et al.*, 2021; JALILZADEH; TUNÇTÜRK; HESARI, 2015; NÁJERA; NIETO; BARRON; ALBISU, 2021; SARAIVA; RODRIGUES; DA SILVA JUNIOR; DA SILVA SCAPIM *et al.*, 2021; SINGH; WANI; KARIM; LANGOWSKI, 2012). Entretanto, a aplicação de muitas delas em queijos frescos, como o QMF, é inviável ou apresenta elevado custo. Dessa forma, o uso de

bacteriófagos líticos pode ser uma alternativa natural interessante no controle de bactérias deteriorantes e extensão da vida de prateleira desse tipo de queijo.

Bacteriófagos, ou fagos, são vírus que infectam exclusivamente as bactérias e são amplamente encontrados na natureza e possuem uma série de vantagens como agentes de biocontrole. Dentre as vantagens destacam-se a especificidade para a bactéria alvo, a capacidade de autorreplicação, a capacidade de penetração em biofilmes, inalteração nas características sensoriais do alimento, adaptação aos hospedeiros, baixa toxicidade inerente, baixo custo e facilidade de isolamento e propagação, resistência às condições de processamento de alimentos e vida útil prolongada (MARTÍNEZ; GARCÍA; RODRÍGUEZ, 2019; O'SULLIVAN; BOLTON; MCAULIFFE; COFFEY, 2019; PUJATO; QUIBERONI; MERCANTI, 2019; SILLANKORVA; OLIVEIRA; AZEREDO, 2012).

O potencial de utilização destes agentes no controle de qualidade e segurança alimentar é amplamente discutido na literatura (CHANG, 2020; ENDERSEN; COFFEY, 2020; GARVEY, 2022; MAHONY; MCAULIFFE; ROSS; VAN SINDEREN, 2011). Estudos indicam a eficiência do uso de bacteriófagos em alimentos na redução ou eliminação de patógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter sakazakii* (AYALA TABARES, 2016; DA SILVA; DA ROCHA NOGUEIRA, 2022; PÉREZ VERGARA; RAMÍREZ LADINO, 2019; SÁNCHEZ ZAPATA; VILLAR DONAIRE, 2022). Além disso, já existem no mercado produtos baseados nestes agentes aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América para uso em alimentos no controle de microrganismos patogênicos (ex. Listex P100TM - EBI Food Safety).

Na indústria de laticínios, os fagos têm sido aplicados em diferentes tipos de queijo, incluindo queijos frescos e macios, Cheddar, coalhada e queijos duros e semiduros, para controlar bactérias como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium tyrobutyricum* (EL HADDAD; ROY; KHALIL; ST-GELAIS *et al.*, 2016; FIGUEIREDO; ALMEIDA, 2017; GARCÍA-ANAYA; SEPULVEDA; SÁENZ-MENDOZA; RIOS-VELASCO *et al.*, 2020; TABLA; GÓMEZ; REBOLLO; MOLINA *et al.*, 2022; ÁVILA; SÁNCHEZ; CALZADA; MAYER *et al.*, 2023). Para QMF os fagos têm sido utilizados principalmente no controle de *Estafilococos* coagulase positiva, *Samonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (CAMPOS, 2022; LIMA; DIIRR; RAMOS; DE FÁTIMA ULISSES *et al.*, 2022; PINTO,



2019; VINHA; DE OLIVEIRA PINTO; CHAVES, 2018). Entretanto, a aplicação de bacteriófagos para controle de *Pseudomonas* em queijos ainda é pouco abordada na literatura. A maioria dos estudos de aplicação de fagos para controle de *Pseudomonas* estão relacionados a leite cru ( DO NASCIMENTO; SABINO; DA ROZA CORGUINHA; TARGINO *et al.*, 2022; MENG; LIU, 2016; TANAKA; YAMADA; TAKEUCHI; INOKUCHI *et al.*, 2018; WONGYOO; SUNTHORNTHUMMAS; SAWAENGWONG; SURACHAT *et al.*, 2023).

Vários fatores podem influenciar a atividade de fagos em queijos, incluindo a multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*, MOI), a estrutura da matriz alimentar, o processamento e o armazenamento e as condições ambientais como temperatura, pH e salinidade (ABEDON, 2016; ACKERMANN; TREMBLAY; MOINEAU, 2004; FISTER; ROBBEN; WITTE; SCHODER *et al.*, 2016; GUENTHER; HUWYLER; RICHARD; LOESSNER, 2009; JOŃCZYK-MATYSIAK; ŁODEJ; KULA; OWCZAREK *et al.*, 2019). A avaliação do potencial de bacteriófagos no controle de deteriorantes em QMF é uma forma de ampliar as possibilidades de conservação desse queijo por meio de um agente natural, trazendo vantagens às indústrias e aos consumidores.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de bacteriófagos líticos no controle de *Pseudomonas fluorescens* em queijo Minas Frescal a fim de reduzir a deterioração e ampliar a vida de prateleira deste produto lácteo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a estabilidade de bacteriófagos em salmoura ao longo do tempo de armazenamento refrigerado;
- 2) Determinar a etapa de adição de bacteriófagos no processo produtivo do queijo Minas Frescal;
- 3) Avaliar o crescimento e capacidade de deterioração de *P. fluorescens* em queijo Minas Frescal ao longo do armazenamento refrigerado.
- 4) Determinar o efeito da adição de bacteriófagos na redução de *P. fluorescens* e na deterioração em queijo Minas Frescal ao longo do armazenamento refrigerado.
- 5) Avaliar a capacidade de bacteriófagos reduzirem a contagem de *P. fluorescens* em salmoura ao longo do tempo de armazenamento refrigerado

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. QUEIJO MINAS FRESCAL (QMF)

O Brasil é um grande produtor de leite e também de derivados lácteos. Em 2021, o país foi classificado como o quarto maior produtor mundial de leite e a atividade leiteira cresce mais que o dobro em relação ao Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, há quase duas décadas (FAOSAT, 2023). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2022, foram produzidos 34.609.218 mil litros de leite e arrecadaram o valor de produção de 80.043.813 mil reais. (CARVALHO; DA ROCHA; CARNEIRO, 2018; IBGE, 2022). Em relação à produção de queijo, em 2020, segundo a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), o Brasil ocupou o sexto lugar entre os maiores produtores mundiais de queijo, confirmando sua importância socioeconômica (OECD., 2020).

De acordo com o Polo SEBRAE agro, o Brasil produziu em 2021 cerca de 818 mil toneladas de queijo e segundo a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a projeção de produção de queijo no país deve aumentar em torno de 2,2% ao ano, até alcançar 945 mil toneladas em 2025 (AGRO, 2023; JOINT; ORGANIZATION; ADDITIVES, 2017). No cenário nacional, são comercializados 50 tipos de queijos no mercado formal, sendo 234 marcas de queijo Prato, 353 muçarela, 263 Minas Frescal, 164 Provolone, 147 Minas Padrão e 45 de queijos ralados. No setor informal, em que os alimentos não são controlados por autoridades estaduais ou federais, essa produção representa aproximadamente 40% da produção total de queijos do país (CHALITA; SILVA; PETTI; SILVA, 2009). O aumento da produção nacional de lácteos é evidenciado pela diminuição de importações desse produto nos últimos anos. Em 2021, o Brasil importou menos 20,5% em quantidade de lácteos em comparação com 2020. A quantidade importada foi de 174 e 137,8 mil toneladas em 2020 e 2021, respectivamente (LEITE; STOCK; RUBACK, 2022).

Já em relação ao consumo, dentre os diversos derivados lácteos, o queijo destaca-se por possuir alto valor nutricional e ser uma excelente fonte de cálcio, proteínas e vitaminas. Estima-se, de acordo com a Associação Brasileira de Indústria de Queijos (ABIQ), que o consumo de queijo no Brasil é de 5,5 quilos por habitante ao ano, ficando atrás de países como Argentina com 11 quilos per capita ano, França

e Itália com 25 quilos per capita ano, enquanto na América do Sul o consumo médio é de 20 quilos per capita ano (DCI, 2018). Um dos principais motivos para o crescimento do consumo de queijo geralmente está relacionado ao aumento do consumo fora de casa, ao aumento da renda da população e ao próprio crescimento populacional (ABIQ, 2014).

De acordo com o Decreto nº 9.013 de 2017, queijo é o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite ou ao leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por microrganismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, de condimentos ou de aditivos. Entende-se por queijo fresco o que está pronto para o consumo logo após sua fabricação. Entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo (BRASIL, 2017). Dentre os queijos produzidos no país, aqueles classificados como queijos frescos destacam-se pela grande variedade e tipo de processos de fabricação. Esses queijos são muito populares e, por apresentarem bons rendimentos durante a produção, são vendidos a um maior número de pessoas a preços acessíveis (DE SENA, 2000). Um dos queijos frescos mais conhecidos, o QMF merece destaque, pois é um dos mais produzidos e consumidos por diferentes faixas etárias e classes sociais conferindo ao alimento um significativo valor socioeconômico e cultural (DE SOUZA; DA SILVA GIOVANNETTI; DE FREITAS SANTOS; GANDRA *et al.*, 2017). Dados da Pesquisa Industrial Anual (PIA) do IBGE de 2020, mostram que a produção brasileira de QMF, somada à de queijo minas padrão, foi de mais de 101 mil toneladas em 2020. Em 2017, o Brasil produziu 92,4 mil toneladas desse tipo de queijo (ESTATÍSTICA-IBGE, 2017 ).

O consumo de QMF destaca-se devido ao reduzido teor de gordura neste produto, sendo frequentemente indicado em dietas com baixo teor de gordura (LISITA, 2005). Sua produção é muito difundida no estado de Minas Gerais em comparação com outros tipos de queijo. No século XVIII, a produção desse produto predominou nas áreas de pecuária leiteira, e com o tempo se espalhou por todo o território do estado. Sua produção é baseada nas técnicas dos imigrantes dinamarqueses e holandeses, tecnologia ainda valorizada na região e passada de geração em geração.

A popularidade desse queijo é justificada pela tradição cultural, hábitos alimentares, baixo preço, processamento simples, rápido retorno do investimento, ausência de maturação e bom rendimento da produção (VINHA; PINTO; SOUZA; CHAVES, 2010). Justamente por não ser maturado, é um produto muito perecível, com vida útil curta, exigindo armazenamento em ambientes refrigerados e consumo rápido (FURTADO, 1999).

Conforme definido pela Portaria nº 352/1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entende-se por QMF, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. Segundo a Instrução Normativa nº 4/2004, o QMF é um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco. A Tabela 1 apresenta a composição centesimal média do queijo Minas Frescal.

Tabela 1: Composição média do queijo Minas Frescal.

<b>Atributos</b>	<b>Concentração</b>
Umidade	55 - 60 %
Sólidos Totais	40 - 45 %
Gordura	17 - 19 %
Gordura no Extrato Seco (GES)	38 - 47 %
Sal	1,2 - 1,6 %
pH*	6,3 - 6,6
pH**	5,1 - 5,2

\*Valor de pH para queijos produzidos sem ácido láctico; \*\*Valor de pH para queijos produzidos com fermento láctico. Fonte: FURTADO (2005).

O queijo Minas Frescal apresenta condições favoráveis para sobrevivência e multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, principalmente, devido ao alto teor de água, alto valor nutricional, alta atividade de água, valor de pH próximo ao neutro. Além disso, é um tipo de queijo com etapas de processamento que permitem a recontaminação, como a enformagem manual e embalagem, onde pode haver contato do queijo com equipamentos, materiais e utensílios mal higienizados, e a higiene pessoal inadequada dos manipuladores (BARAN; ERDOĞAN; TURGUT; ADIGÜZEL, 2017; FURTADO, 2017; MARTINS, 2018; RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICZ, 2009).

O processo de fabricação do QMF e suas variações estão representados na Figura 1. Para dar início a produção do queijo, é necessário a realização da

pasteurização do leite, que permite a eliminação de microrganismos patógenos e redução de deteriorantes a níveis aceitáveis. Após o processo de pasteurização, é necessário adicionar cloreto de cálcio para aumentar o teor de cálcio solúvel, pois o existente naturalmente fica indisponível quando o leite é pasteurizado. Além disso, ajuda a acelerar a coagulação do leite e dá elasticidade à massa do queijo (DA CONCEIÇÃO; DA SILVA; DE OLIVEIRA; SOARES *et al.*, 2009). De acordo com Silva (2005), o leite pasteurizado é preparado para a coagulação da caseína, sua principal proteína, através da adição do coalho. O coalho é um composto de proteinases (quimosina e pepsina) adicionado ao leite que promove a sua coagulação, resultando em massa de queijo, chamada de coalhada. A coagulação inicia-se após a adição do coalho e leva cerca de 45 minutos (SILVA, 2005).

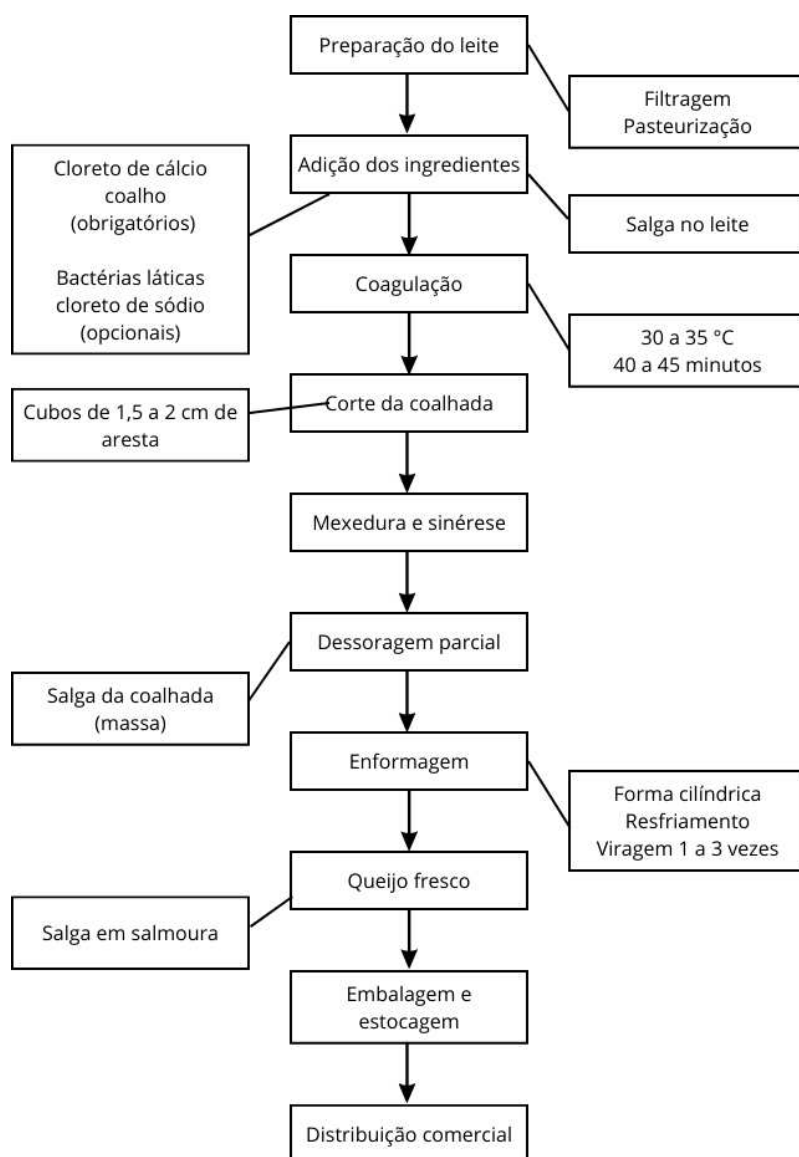


Figura 1: Fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal. Elaborado pelo autor.

Após o processo de coagulação, inicia-se o corte da coalhada, a massa é cortada por liras verticais e horizontais em cubos, e inicia-se o processo de sinérese com mexeduras intercaladas com momentos de repouso da massa. Após atingir a consistência adequada, parte do soro de leite é retirada e inicia-se o processo de enformagem, muitas vezes de forma manual, o queijo é moldado em sua forma característica (FREITAS, 2015). O QMF não precisa ser prensado porque possui um teor de umidade característico que precisa ser mantido. O queijo é então salgado para garantir o controle de umidade, preservação e sabor. Para promover a salga dos queijos existem diferentes formas: salga por imersão em salmoura, salga da massa, na superfície do queijo (salga a seco), salga mista e a salga direta no leite (OLIVEIRA; LIRA; TORRES; SOARES *et al.*, 2008).

Na fabricação de QMF, um dos métodos de salga mais comuns é por imersão em salmoura. O tempo de permanência dos queijos nos tanques de salmoura depende do peso, formato, tamanho, do teor de sal desejado e da umidade do queijo (GUSSO, 2009). Após a salga, o queijo é embalado em sacos plásticos e armazenado em baixas temperaturas para garantir sua conservação (SILVA, 2005). O prazo de validade do queijo Minas Frescal depende do processo de produção e pode variar entre 10 e 20 dias quando refrigerado de 2 a 4 °C (FERREIRA; DOS SANTOS, 2022).

### 3.2. CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE QMF

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor e acarreta grandes prejuízos econômicos (PERRY, 2004). Devido ao risco apresentado à saúde pública, o processo de fabricação até a comercialização ao consumidor final é fiscalizado. O MAPA é o responsável pela fiscalização dos produtos de origem animal, como QMF, até a expedição da indústria, enquanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fiscaliza a qualidade desses alimentos quando dispostos para comercialização.

De acordo com a ANVISA, os padrões microbiológicos para queijos de alta umidade são estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada – nº331/2019 e a Instrução Normativa nº60/2019. Já para o MAPA, os padrões microbiológicos para esses tipos de queijos são estabelecidos pela Portaria MAPA – nº 146/1996 (Tabela 2).

Tabela 2: Padrões microbiológico e limites estabelecidos pela Portaria n°146/1996 (MAPA) e pela Instrução Normativa n°60/2019 (ANVISA) para queijo Minas Frescal

Legislação	Requisitos microbiológicos
Portaria n°146 - MAPA (07/03/1996)	Coliformes/g (30 °C): n=5, c=2, m=10, M=1000
	Coliformes/g (45 °C): n=5, c=2, m=50, M=500
	Estafilococos coagulase positiva/g: n=5 c=1 m=100 M=500
	<i>Salmonella</i> sp./25g: ausente
	Fungos e leveduras/g: n=5, c=2, m=500, M=5000
Resolução RDC n° 331– ANVISA (23/12/2019)	<i>Listeria monocytogenes</i> /25g: ausente
	<i>Escherichia coli</i> /g: n=5, c=1, m=100, M=1.000
	Estafilococos coagulase positiva/g: n=5 c=2 m=100 M=1000
	<i>Salmonella</i> sp./25g: ausente
	<i>Listeria monocytogenes</i> /25g: n=5, c=0, m=100
	Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g): ausentes

\*n= número de amostras a ser analisada, M= limite superior, m= limite inferior, c= número máximo de amostras permitido entre m e M. Valores expressos em Unidade Formadora de Colônias (UFC) ou Número Mais Provável (NMP) por grama.

A contaminação do queijo por *Pseudomonas* pode se originar de diferentes fontes, desde a obtenção da matéria prima até o processo de fabricação e embalagem do queijo. Dentre elas, o uso de leite de vacas com mastite, infecção causada por microrganismos externos à glândula mamária, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, o controle sanitário insuficiente do rebanho, a ausência de pasteurização, as condições higiênicas insuficientes em toda a cadeia produtiva, temperaturas e formas de armazenamento inadequadas e hábitos higiênicos inadequados durante o manejo, contribuem para a contaminação do queijo (DOS SANTOS; SOUSA; MELO, 2019; KÜMMEL; STESSL; GONANO; WALCHER *et al.*, 2016; MEDEIROS, 2019).

Outra fonte de contaminação é a salga em salmoura. A reutilização das salmouras, um procedimento comum na indústria de laticínios, pode alterar as características de pH, nutrientes e aumentar a contaminação microbiana dos queijos. A filtração e tratamento térmico são medidas usadas para recuperar e manter a qualidade da salmoura. Entretanto, não existe critério microbiológico para qualidade de salmoura (BRASIL, 1996). Existem poucas pesquisas que descrevem o perfil microbiológico de salmouras, o que faz com que essa importante etapa do processo de produção seja negligenciada na contaminação dos queijos. Nos estudos sobre qualidade microbiológica de salmoura, as contagens de coliformes totais, coliformes



termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras, aeróbios mesófilos e psicotróficos ultrapassaram 5,0 Log UFC/mL (LISITA, 2005; SILVA; COELHO; ROCHA; NEVES *et al.*, 2017).

Apesar da legislação vigente, diversos estudos apontam contaminações de microrganismos deteriorantes e patogênicos em QMF em todo o Brasil. Esses casos evidenciam um quadro desfavorável da qualidade deste alimento independente da sua origem de fabricação. A Figura 2 apresenta resultados de alguns estudos sobre contaminações microbianas de QMF superiores aos limites estabelecidos pela legislação (Portaria nº146/1996 do MAPA e pela Instrução Normativa nº60/2019 da ANVISA para queijo Minas Frescal).

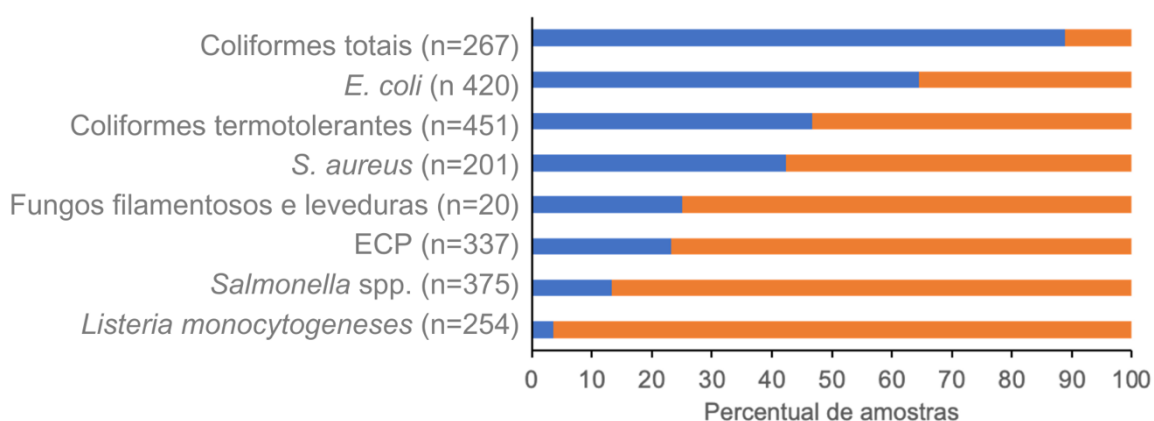


Figura 2: Análise bibliográfica de contaminação microbiana em queijo Minas Frescal no Brasil.

Amostras que estavam em desacordo com a legislação vigente (azul) e amostras que estavam em acordo com a legislação vigente (laranja). \*n= número de amostras de queijo avaliadas nos estudos. ECP - Estafilococos coagulase positiva. Total de estudos: foram analisados vinte e cinco (25) artigos científicos publicados nos últimos dez (10) anos.

Os resultados de contaminação microbiana de QMF em cada um dos estudos são reportados na Tabela 3.

Tabela 3: Exemplos de contaminação microbiana em queijo Minas Frescal no Brasil e inconformidades segundo a *Portaria n°146 -MAPA (07/03/1996)* e *Resolução RDC n° 331– ANVISA (23/12/2019)*.

Referência	Local de estudo	Número de amostras	N amostras/ Tipo de produção		Coliformes a 45° C (termotolerantes)		<i>E. coli</i>	Bolors e Leveduras	Estafilococos coagulase pos.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
			Caseiro	Industrializado	Coliformes a 35°C	(%) de amostras inconformes						
ZONTA et al. (2013)	Arapongas, PR	54	0	54	100	S/D	100	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
Morais; Rezende, 2013	Brasília e Taguatinga, DF	10	0	10	S/D	80	50	S/D	S/D	Ausente	S/D	Ausente
Apolinario et al. (2014)	Zona da Mata, MG	31	0	31	S/D	54,8	77,4	S/D	16,12	Ausente	9,6	S/D
Cruz et al., 2014	Bahia	77	0	77	S/D	96,3	S/D	S/D	3,7	Ausente	Ausente	S/D
Costa et al., 2015	São Paulo, SP	30	15	15	80	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
Valiatti et al., 2015	Ji, PR	4	4	0	S/D	100	100	S/D	S/D	Ausente	100	Ausente
Chesca et al., 2015	Uberaba-MG	10	S/D	S/D	S/D	S/D	Ausente	S/D	S/D	Ausente	Ausente	50
Silva, 2015	Goiânia, Goiás	10	5	5	S/D	14,3	100	12,5	S/D	S/D	S/D	S/D
DIAS et al., 2016	Região Sul de Goiás	10	5	5	S/D	50	50	S/D	S/D	Ausente	S/D	30
Feitosa et al., 2016	Morrinhos-GO	37	0	37	S/D	S/D	86,49	S/D	S/D	S/D	S/D	35,14

Referência	Local de estudo	Número de amostras	N amostras/ Tipo de produção		Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C (termotolerantes)	<i>E. coli</i>	Bolors e Leveduras	Estafilococos coagulase pos.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
			Caseiro	Industrializado								
Da Silva et al., 2016	Sudoeste da Bahia	18	0	18	S/D	S/D	83,3	S/D	S/D	S/D	S/D	100
Vinha et al., 2016	Viçosa, MG	77	S/D	0	75	25	S/D	S/D	25	Ausente	S/D	S/D
Garcia et al., 2017	Campinas, SP	10	5	5	65	25	60	35	50	40	Ausente	S/D
De SOUZA et al., 2017	Zona da Mata, MG	50	7	43	100	40	32	S/D	20	40	Ausente	S/D
Oliveira et al., 2017	Londrina, PR	36	0	36	100	27,8	55,6	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
Vinha et al., 2018	Viçosa, MG	78	32	46	S/D	S/D	S/D	S/D	39,7	S/D	S/D	S/D
Silva; Belo, 2018	Sete Lagoas, MG	4	4	0	S/D	50	S/D	S/D	75	Ausente	S/D	S/D
Lima et al., 2019	Distrito Federal	20	20	0	S/D	100	100	S/D	S/D	95	S/D	S/D
Bastistella et al., 2019	Barra do Bugres – MT	18	18	0	S/D	16,67	27,78	S/D	S/D	Ausente	Ausente	S/D
Pinto, 2019	Rolim de Moura	30	S/D	S/D	S/D	10	43,4	S/D	S/D	S/D	S/D	100

Referência	Local de estudo	Número de amostras	N amostras/ Tipo de produção		Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C (termotolerantes)	<i>E. coli</i>	Bolores e Leveduras	Estafilococos coagulase pos.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
			Caseiro	Industrializado								
Ferrari; São José, 2019	Espírito Santo	28	0	28	S/D	S/D	78,3	S/D	S/D	S/D	S/D	39,3
Feraga et al., 2020	Itaperuma, RJ	S/D	S/D	S/D	S/D	100	S/D	S/D	50	Ausente	S/D	S/D
Silva; Ferreira, 2021	Uberlândia -MG	10	5	5	90	60	S/D	S/D	20	S/D	S/D	S/D
LIMA et al., 2022	Sul Espírito Santo	4	4	0	S/D	25	75	S/D	S/D	100	Ausente	100
campos 2022	Botucatu, São Paulo	50	S/D	S/D	S/D	30	34	S/D	S/D	6	4	2

Valores apresentados em porcentagem. \*S/D= a informação não pôde ser obtida a partir dos dados do estudo referenciado.

Coliformes foram o principal grupo de microrganismo responsável por inconformidades nas amostras de QMF com os padrões legais vigentes. A presença desse grupo é um importante indicador de condições higiênico sanitárias irregulares e podem causar grandes perdas econômicas na indústria (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Além disso, a presença de coliformes favorece a produção de gases e defeito de estufamento precoce em queijos frescos (TABLA; GÓMEZ; REBOLLO; MOLINA *et al.*, 2022). Entretanto, outros grupos microbianos considerados importantes deteriorantes de queijos são pouco investigados e quantificados em QMF. Microrganismos psicrotróficos são importantes deteriorantes de queijos frescos armazenados refrigerados. A presença desse grupo em leite e derivados é influenciada pelas condições de higiene na ordenha, duração do período de armazenamento ou até mesmo contaminação pós-pasteurização (MACHADO; BAGLINIÈRE; MARCHAND; VAN COILLIE *et al.*, 2017; RABELO; RICARDO; PORFIRIO; PIMENTEL *et al.*, 2021; VAN TASSELL; MARTIN; MURPHY; WIEDMANN *et al.*, 2012). Mesmo com armazenamento refrigerado, o QMF fica exposto ao crescimento de bactérias psicrotróficas e, conseqüentemente, produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas por essas bactérias (GOULART; PINTO, 2021; MIRANDA, 2020). Neste sentido, o gênero *Pseudomonas* merece destaque devido a sua frequência de isolamento e problemas relacionados ao seu crescimento em leite e derivados.

### 3.3. PSEUDOMONAS EM QUEIJOS

*Pseudomonas* são bactérias gram-negativas em forma de bastonete, móveis devido à presença de flagelos polares, aeróbios estritas e não formadoras de esporos. O gênero *Pseudomonas* predomina dentre os psicrotróficos encontrados no leite, sendo as espécies mais comumente isoladas *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* (DE LONGHI; DE SOUZA CORREIA; BRUZAROSKI; POLI-FREDERICO *et al.*, 2022). Essas bactérias podem ser encontradas no solo, água, ar, poeira e vegetais e apresentam capacidade de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas resistentes a tratamentos térmicos usualmente empregados na indústria de laticínios. Os principais problemas causados por *Pseudomonas* em lácteos estão relacionados com defeitos de sabor amargo, odor, cor e consistência indesejáveis no produto final, bem como, gelatinização de leite UHT, rancidez em manteiga, perda de

rendimento em queijos (DA SILVA COSTA; DA SILVA RODRIGUES; DE CARVALHO; MACHADO, 2022; DE ANDRADE PAULO; MONTANHINI; RIBEIRO, 2021).

*Pseudomonas* têm sido encontradas com frequência em queijos e associadas a problemas tecnológicos e de vida de prateleira. Estudos reportaram o gênero *Pseudomonas* como principal contaminante em amostras de queijo Minas Frescal (DE PAULA; MEDEIROS; FERNANDES; DA SILVA et al., 2021; FEITOSA; BORGES; DE PAULA; BARBOSA et al., 2016; SARAIVA; RODRIGUES; DA SILVA JUNIOR; DA SILVA SCAPIM et al., 2021; STELLATO; DE FILIPPIS; LA STORIA; ERCOLINI, 2015). Outro importante problema associado à contaminação por *Pseudomonas* é o desenvolvimento de pigmentação azul em queijos frescos. Diversos estudos foram desenvolvidos para investigar as causas da coloração em queijos e alguns desses relacionaram a coloração com a ocorrência de *P. fluorescens* (CARMINATI; BONVINI; ROSSETTI; ZAGO et al., 2019; CARRASCOSA; MARTÍNEZ; SANJUÁN; MILLÁN et al., 2021; DA SILVA RODRIGUES; MACHADO; DE CARVALHO; NERO, 2021; DEL OLMO; CALZADA; NUÑEZ, 2018). Em 2021, pela primeira vez no país, foram investigadas e identificadas estirpes de *Pseudomonas* causadoras da coloração azul de QMF, incluindo *Pseudomonas carnis* (DA SILVA COSTA; DA SILVA RODRIGUES; DE CARVALHO; MACHADO, 2022). A deterioração específica que gera a pigmentação azul ocorre geralmente em queijos frescos com alto teor de umidade e pH alto (entre 5,3 e 6,0) e é desenvolvida mesmo em armazenamento em baixas temperaturas (CARMINATI; BONVINI; ROSSETTI; ZAGO et al., 2019). Vale ressaltar que a pasteurização do leite é eficiente no controle de *Pseudomonas* em leite cru, entretanto, falhas durante o processo de fabricação do queijo pode permitir a recontaminação por algumas estirpes prevalentes no ambiente produtivo. No Brasil, a indústria de laticínios tem relatado com frequência a ocorrência dessa deterioração no QMF. Entretanto, devido à falta de informações científicas nacionais a respeito, muitas pessoas acabam associando erroneamente essa deterioração a resíduos químicos nos produtos finais (RIBEIRO; FREIRE; SILVEIRA; CARVALHO, 2023).

A presença desse tipo de bactéria é responsável por grandes prejuízos financeiros à indústria de laticínios e, portanto, deve haver um controle rigoroso na produção de queijos tipo Minas Frescal. Muitos psicrotóxicos são destruídos na pasteurização do leite, incluindo *Pseudomonas*, mas eles podem recontaminar os queijos por falhas higiênicas no processo produtivo, portanto, a higienização de toda

a fábrica deve ser reforçada. A exposição da matéria-prima a condições higiênico-sanitárias inadequadas pode comprometer a qualidade dos queijos. Alguns estudos reportaram a presença de *Pseudomonas* dentro das plantas produtivas de queijo, incluindo na salmoura (CARMINATI; BONVINI; ROSSETTI; ZAGO *et al.*, 2019; CASTRO; DA SILVA FERNANDES; KABUKI; KUAYE, 2021; STELLATO; UTTER; VOORHIS; DE ANGELIS *et al.*, 2017). Rovedilho (2023) cita que falhas nos procedimentos de higienização podem favorecer a contaminação e crescimento de *Pseudomonas* em produtos lácteos e, portanto, deve haver sanitização eficiente das instalações produtivas.

Além das condições higiênico-sanitárias, algumas tecnologias podem ser utilizadas para ampliar a vida de prateleira de queijos, incluindo o uso de aditivos antimicrobianos de origem vegetal natural, atmosfera modificada ou embalagens ativas, revestimentos comestíveis, uso de fotossensibilizadores e de dióxido de carbono e altas pressões hidrostáticas (BARUKČIĆ; ŠČETAR; MARASOVIĆ; LISAK JAKOPOVIĆ *et al.*, 2020; CHRISTAKI; MOSCHAKIS; KYRIAKOUDI; BILIADERIS *et al.*, 2021; JALILZADEH; TUNÇTÜRK; HESARI, 2015; NÁJERA; NIETO; BARRON; ALBISU, 2021; SARAIVA; RODRIGUES; DA SILVA JUNIOR; DA SILVA SCAPIM *et al.*, 2021; SINGH; WANI; KARIM; LANGOWSKI, 2012). Entretanto, a aplicação de muitas delas em queijos frescos, como o QMF, é inviável ou apresenta elevado custo. Dessa forma, o uso de bacteriófagos líticos pode ser uma alternativa natural interessante no controle de bactérias deteriorantes e extensão da vida de prateleira desse tipo de queijo.

### 3.4. BACTERIÓFAGOS NO CONTROLE MICROBIANO DE QUEIJOS

Bacteriófagos, também denominados fagos (Figura 3), são vírus capazes de infectar bactérias, incluindo aqueles de importância em alimentos, com especificidade variável para família, gênero, espécie ou estirpe. O uso de fagos para o biocontrole dos seus hospedeiros traz benefícios como: segurança, isolamento e propagação fáceis e de baixo custo, eficácia em doses baixas, extensão da vida útil dos alimentos e manutenção das propriedades sensoriais dos alimentos. A principal vantagem de utilizar fagos é a capacidade desse vírus na adsorção e infecção de hospedeiros bacterianos sem modificar as características sensoriais como aparência, sabor e aroma dos alimentos (ROGOVSKI *et al.*, 2021). Seu uso na indústria de alimentos indica seu grande potencial de prevenção e redução de populações de bactérias de

grande relevância, em quantidades expressivas, em produtos alimentícios e no ambiente de produção (COSTA; PASTRANA; TEIXEIRA; SILLANKORVA *et al.*, 2023; HAGENS; LOESSNER, 2007; PUJATO; QUIBERONI; MERCANTI, 2019; SILLANKORVA; OLIVEIRA; AZEREDO, 2012). É justamente esta especificidade em relação ao hospedeiro, determinada por receptores das estruturas do envelope celular das bactérias, um dos fatores fundamentais no sucesso no uso de fagos para controle biológico (MATHIEU; YU; ZUO; DA SILVA *et al.*, 2019).

Os bacteriófagos são ubíquos e estão diretamente relacionados com a quantidade de bactérias presente no ambiente, representando a forma de vida mais abundante do planeta, com uma estimativa de  $10^{32}$  bacteriófagos, estando presente em todos os meios onde existe o hospedeiro. A descoberta desses vírus foi atribuída a Felix d'Herelle, em 1917 (FURFARO; CHANG; PAYNE, 2018). Desde sua descoberta, os fagos vêm sendo propostos para diversos fins como a fagoterapia, sistema de entrega de medicamentos, agentes de controle biológico, dentre outros (GARCIA; MARTINEZ; OBESO; RODRIGUEZ, 2008; PINTO; ALMEIDA; AZEREDO, 2020).

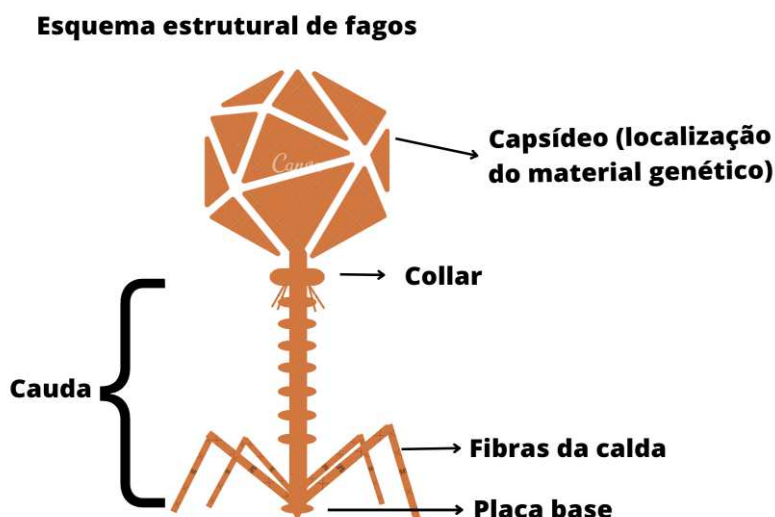


Figura 3: Esquema estrutural de um bacteriófago caudado. Elaborado pelo autor.

Os fagos são classificados e divididos em diferentes famílias dependendo da sua morfologia, composição de ácidos nucleicos, estrutura do capsídeo e gama de hospedeiros. O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) é responsável pela classificação taxonômica de bacteriófagos. A grande maioria dos fagos identificados até agora pertence à classe *Caudoviricetes*, que atualmente está dividida



em 7 ordens, 44 famílias e 44 subfamílias (MATTHIJNSSENS; ATTOUI; BÁNYAI; BRUSSAARD *et al.*, 2022). Ela contém fagos de comprimentos variados de cauda com capsídeos icosaédricos e um genoma de DNA de fita dupla (TURNER; KROPINSKI; ADRIAENSSENS, 2021; TURNER; SHKOPOROV; LOOD; MILLARD *et al.*, 2023). No entanto, estes números estão em constante mudança devido ao rápido aumento dos dados de genomas sequenciados disponíveis.

Desde sua descoberta, esses vírus vêm sendo estudados em função do seu potencial no controle biológico de bactérias de interesse na medicina humana e na indústria alimentícia. Os fagos vêm sendo utilizados para uso terapêutico devido ao surgimento de bactérias resistentes a antibióticos. Já existem estudos em humanos com administração intravenosa de bacteriófagos em casos de infecção por estirpes resistentes que demonstram sua eficácia (CISEK; DĄBROWSKA; GREGORCZYK; WYŻEWSKI, 2017; DA SILVA; DA ROCHA NOGUEIRA, 2022; GRANDO, 2021; VAZ; RECH; COLDEBELLA, 2022). Em 2006, o FDA aprovou o uso de bacteriófagos como conservantes de alimentos e no controle de estirpes bacterianas em vegetais frescos, carnes e derivados (SAFWAT MOHAMED; FAROUK AHMED; MOHAMED MAHMOUD; ABD EL-BAKY *et al.*, 2018).

#### 3.4.1. Ciclos de Infecção

O princípio do tratamento com fagos envolve o reconhecimento do hospedeiro para iniciar o processo de infecção. Este encontro é o resultado da colisão aleatória de fago-bactéria por meio de movimento browniano (KASMAN; KASMAN; WESTWATER; DOLAN *et al.*, 2002). Após o reconhecimento, ocorre a ligação do fago à superfície da bactéria (BERTOZZI SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016). O fago então usa enzimas para induzir a formação de um poro no envelope celular através do qual o material genético é injetado. Esse processo ocorre de diferentes formas de acordo com o tipo de cauda presente no fago (ORLOVA, 2012; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). As interações fago-bactéria são mediadas pelas proteínas distais dos fagos, conhecidas como proteínas de ligação ao receptor (*receptor-binding proteins* - RBPs), que são os principais fatores que determinam a ligação específica (NOBREGA; VLOT; DE JONGE; DREESENS *et al.*, 2018).

Os bacteriófagos podem apresentar dois tipos de ciclo de infecção principais: lise da célula, ocasionada por bacteriófagos virulentos (ou líticos), ou permanência na célula hospedeira devido à integração do DNA do fago ao DNA do hospedeiro,

ocasionado pelos bacteriófagos temperados (ou lisogênicos), num estado chamado lisogenia (KENNY; MCGRATH; FITZGERALD; VAN SINDEREN, 2004) (Figura 4).

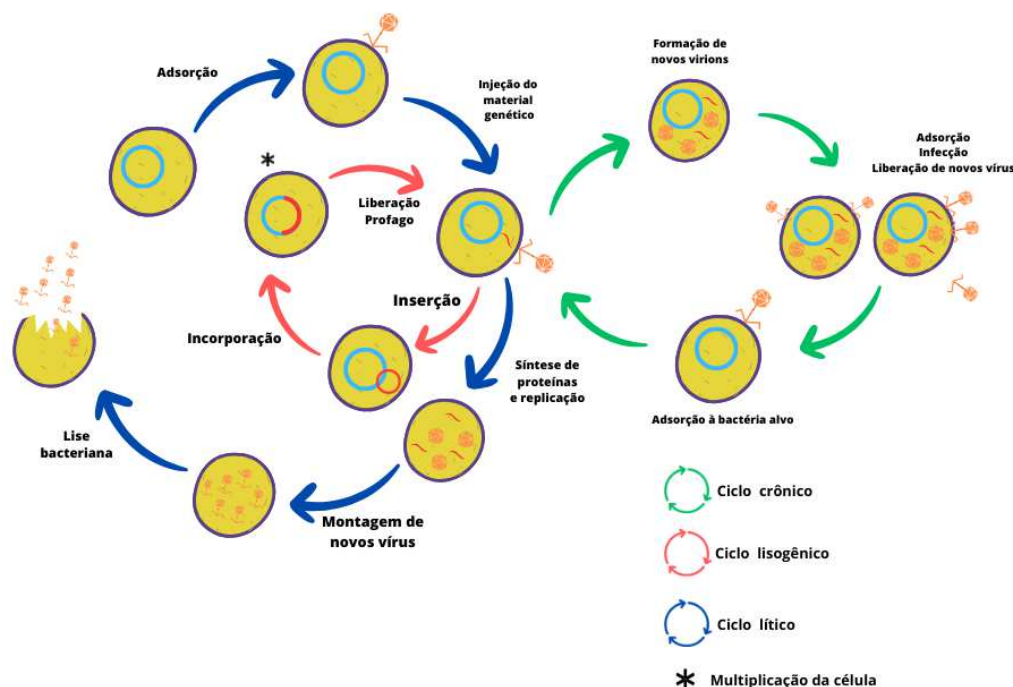


Figura 4: Processo de infecção da bactéria por meio de ciclo lítico ou lisogênico. Adaptado de Feiner *et al.* (2015). Elaborado pelo autor.

Outro ciclo importante no processo de infecção por fagos é o ciclo crônico. Nesse tipo de ciclo de infecção o fago insere seu material genético no genoma de seu hospedeiro, sendo replicado a cada ciclo celular, sem ocorrer a lise da célula da bactéria (ROGOVSKI; CADAMURO; DA SILVA; DE SOUZA *et al.*, 2021). No ciclo lítico, após a introdução do material genético na bactéria, a maquinaria celular do hospedeiro é direcionada para a produção dos componentes fágicos, como proteínas virais (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Por fim, ocorre a montagem de novos virions e a produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular bacteriana, permitindo a liberação dos fagos no meio externo mediante a inativação do hospedeiro (HAGENS; LOESSNER, 2007; ORLOVA, 2012; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Enquanto no caso do ciclo lisogênico, o DNA viral se integra ao DNA bacteriano e é replicado junto com o DNA da bactéria para novas gerações. Quando o DNA do fago está incluso no DNA da bactéria ele é chamado de profago e pode ser transmitido pela divisão celular às próximas gerações (QUIBERONI; GUGLIELMOTTI; REINHEIMER, 2003). A partir desse momento, o fago apresenta-se na forma latente,

sendo sintetizadas apenas proteínas de repressão, que inibem a transcrição de outros genes, além de proteínas ligadas a imunidade da bactéria às novas infecções (MIRZAEI; MAURICE, 2017) MIRZAEI; MAURICE, 2017). Os fagos que utilizam esse tipo de ciclo se distinguem por possuírem genes que codificam a proteína integrase (INT), enzima que medeia a recombinação do DNA do fago com o do hospedeiro, fatores determinantes no ciclo de infecção dos bacteriófagos (GROTH; CALOS, 2004).

A eficácia da interação fago-bactéria é determinada por fatores intrínsecos e fatores externos. Como primeiro fator pode-se citar a MOI, razão entre o número de fagos e o número de células bacterianas. Assim, a MOI reflete a probabilidade de que uma célula hospedeira terá pelo menos um fago que leva à infecção (ABEDON, 2016; LY-CHATAIN, 2014). Em um estudo de Sharma *et al.* (2021), uma redução de 90% em populações da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi observada em uma MOI de 1, enquanto uma redução de 52% foi observada em uma MOI de 0,1. No entanto, mesmo em MOIs mais baixas, os autores alcançaram uma redução significativa no número de bactérias em comparação com o controle, com reduções de 42% e 37% em MOIs de 0,01 e 0,001, respectivamente. Em outro estudo utilizando camundongos infectados com *P. aeruginosa* e tratados com fagos, observou-se 100% de sobrevivência e os animais não apresentaram sinais de infecção em MOIs de 10 e 100 (ARUMUGAM; MANOHAR; SUKUMARAN; SADAGOPAN *et al.*, 2022).

Condições físicas e químicas tais como pH, temperatura e salinidade também interferem no processo de infecção dos fagos. Esses fatores podem levar a perda de lipídios dos fagos envelopados e/ou DNA, mudanças estruturais assim como inativação do fago por meio da supressão da sua estrutura (cabeça, cauda e envelope) e por isso influenciam na ocorrência, viabilidade e capacidade de infecção de bacteriófagos (ACKERMANN; TREMBLAY; MOINEAU, 2004; JOŃCZYK-MATYSIAK; ŁODEJ; KULA; OWCZAREK *et al.*, 2019).

A temperatura desempenha um papel fundamental na fixação, penetração, multiplicação e duração do período latente. De acordo com Gouvêa *et al.* (2016), como os fagos dependem da função metabólica do hospedeiro, as mudanças fisiológicas causadas pela alteração da temperatura de incubação da bactéria também influenciam o fago. Temperaturas mais altas podem levar a uma fase de latência

prolongada e podem inativar os fagos (JOŃCZYK; KŁAK; MIĘDZYBRODZKI; GÓRSKI, 2011; TEY; OOI; YONG; NG *et al.*, 2009).

Crespo (2021), avaliou as mudanças fenotípicas e genotípicas sofridas por um bacteriófago de RNA quando propagado em temperaturas diferentes e observou que o aumento de temperatura (de 37 °C para 43 °C) influenciou na velocidade de adaptação e na estrutura da população e na diversidade genética nela contida. Em outro estudo, observou-se que a temperatura influenciou na eficiência da interação fago-bactéria. Em temperaturas abaixo do ótimo de crescimento para a bactéria, menos material genético do fago penetrou na célula hospedeira bacteriana (JOŃCZYK-MATYSIAK; ŁODEJ; KULA; OWCZAREK *et al.*, 2019).

Assim como a temperatura, a acidez e a salinidade são fatores que influenciam na estabilidade do fago. O pH é um fator de grande importância, visto que rege o equilíbrio das formas nitrogenadas (BOLSAN, 2023). Cada bacteriófago apresenta seu ótimo de pH, entretanto pH ácidos limitam a proliferação de muitos fagos e, dependendo da duração da exposição, mesmo valores de pH ligeiramente mais altos podem tornar as partículas virais inativas (JOŃCZYK; KŁAK; MIĘDZYBRODZKI; GÓRSKI, 2011). O choque osmótico de íons e a salinidade também são fatores apontados como inativadores de bacteriófagos (DAVIS; SILVEIRA; FLEET, 1985).

### 3.5. APLICAÇÃO DE FAGOS EM QUEIJOS

Na literatura é possível encontrar estudos sobre como os bacteriófagos têm sido aplicados para inativar *S. aureus* em queijos frescos e maturados e para prevenir a formação de biofilme (DE CASTRO, 2019; YOUSSEF; AGÚN; FERNÁNDEZ; KHALIL *et al.*, 2023). Outros autores avaliaram um coquetel de bacteriófagos líticos no controle de estirpes de *E. coli* em diferentes matrizes alimentares e temperaturas. O número de células de *E. coli* foi significativamente reduzido na matriz láctea, caindo abaixo do limite de detecção ( $<10^1$  UFC/mL) a 4 °C e diminuindo de 2 a 4 log UFC/mL a 24 °C após 24 h de exposição (PINTO, 2019; TOMAT; BALAGUÉ; AQUILI; VERDINI *et al.*, 2018). Figueiredo, Miranda e Almeida (2014), ao estudarem a eficiência com fago do tipo P0100 em queijos macios, observaram reduções de 0,8 e 1,0 log UFC/g para *Listeria monocytogenes*. A Tabela 4 apresenta alguns desses trabalhos.

1

Tabela 4: Exemplo de aplicação de fagos em diferentes tipos de queijo e características da aplicação

<b>Produto</b>	<b>Bactéria alvo (concentração)</b>	<b>Fago (concentração)</b>	<b>Forma de aplicação</b>	<b>Redução</b>	<b>Tempo (Condições)</b>	<b>Referência</b>
Queijo Cheddar	<i>S. aureus</i> (6 log/ml)	Coquetel ( $\Phi$ 812 /44AHJD / $\Phi$ 2) (MOI 15/45/150)	Leite pasteurizado	4 log	$\leq$ LOD (2 log) 0 d (4 ° C)	Haddad et al. (2016)
Queijo Cheddar	<i>S. aureus</i> (6 log/mL)	Coquetel (Team1/P68/LH1-MUT) (MOI 15/45/150)	Leite pasteurizado	4 log	$\leq$ LOD (2 log) 0 d (4 ° C)	Haddad et al. (2016)
Queijo duro	<i>L. monocytogenes</i> (4 log/g)	Produto ListShield (coquetel) (8 log)	Superfície	2,8 log	4 d (4 ° C)	Perera et al. (2015)
Requeijão	<i>L. monocytogenes</i> (5 log/g)	P100 (7 log)	Superfície	0,8 log	7 d (10 ° C)	Silva et al. (2014)
Queijo macio	<i>L. monocytogenes</i> (5 log/g)	P100 (7 log)	Superfície	1 log	7 d (10 ° C)	Silva et al. (2014)
Queijo duro	<i>S. aureus</i> (6 log/mL)	Coquetel ( $\Phi$ IPLA35, $\Phi$ IPLA88) (6 log)	Leite pasteurizado	5,5 log	30 d (11 ° C)	Bueno et al. (2012)
Queijo fresco	<i>L. monocytogenes</i> (4 log/g)	P100 (8 log)	Superfície	3,5 log	Lise: 1 d; Recrescimento: 7 d (ambos a 4 ° C)	Soni et al. (2012)

2

Produto	Bactéria alvo (concentração)	Fago (concentração)	Forma de aplicação	Redução	Tempo (Condições)	Referência
Queijos com manchas vermelhas	<i>L. monocytogenes</i> (2 log/cm <sup>2</sup> ) <i>L. monocytogenes</i> (1 log/cm <sup>2</sup> ) <i>L. monocytogenes</i> (3 log/cm <sup>2</sup> )	A511 (8 log) Três doses (1 h, 3 d e 6 d / 8 log) Duas doses (1 h e 6 d / 8 log)	Superfície	1,8 log a 1 log 3,3 log a 3,4 log 3,1 a 3,5 log	6 d (12–13 ° C) 1 d (12–13 ° C) 12 d (12 a 13 ° C) e 11 d (6 ° C) 11 d (12 a 13 ° C) e 11 d (6 ° C)	Guenther e Loessner (2011)
Queijos macio mofo branco	<i>L. monocytogenes</i> (3 log/cm <sup>2</sup> )	A511 Duas doses (1 e 20 h / 8 log) 8 log 9 log	Superfície	2,5 log 2,4 log 2,9 log	10 d (12 a 13 °C) e 10 d (6 °C) 8 d (12 a 13 °C) e 10 d (6 °C) 9 d (12 a 13 °C) e 10 d (6 °C)	Guenther e Loessner (2011)
Queijo mancha vermelha suave	<i>L. monocytogenes</i> (1 log/cm <sup>2</sup> )	P100 7 log Sete doses (7 log) Sete doses (6 log)	Superfície	<sup>a</sup> 1,6 log <sup>a</sup> 1,6log <sup>b</sup> 1,6 log	6 d (14 °C) 6 d (14 °C) Lise: 6 d; Recrescimento: 10 d (ambos a 14 °C)	Carlton et al. (2005)
Queijo cheddar	<i>S. enteritidis</i> (4 log/mL)	SJ2 (8 log) (8 log)	Leite pasteurizado Leite cru	3,7 log a 2,4 log	90 d (8 ° C) 99 d (8 ° C)	Modi et al. (2001)
Coalho ácido / coalho	<i>S. aureus</i> SMQ-1320 (6 log/mL)	Coquetel (Team1/P68/LH1-MUT) (MOI 15, 45 e 150)	Leite pasteurizado	1-3 log	32-38 ° C	Haddad et al. (2016)
Coalhada mole Coalho dura	<i>S. aureus</i> Sa9 (6 log/mL)	Coquetel (ΦIPLA35, ΦIPLA88) 6 log	Leite pasteurizado	5,6 log a 7,2 log	45 m (32 ° C) 6 h (pH 5,3)	Bueno et al. (2012)

Produto	Bactéria alvo (concentração)	Fago (concentração)	Forma de aplicação	Redução	Tempo (Condições)	Referência
Coalhada ácida Coalhada Coalho	<i>S. aureus</i> Sa9 (6 log/mL)	Coquetel de fago (ΦIPLA35, ΦIPLA88) 8 log (MOI 250) 8 log (MOI 350)	Leite pasteurizado	7,2 log a 6,5 log	4 h (25 ° C) 1 h (30 ° C)	García et al. (2007)
Leite integral e desnatado	<i>P. fluorescens</i>	L23.2, P22.1, and A11.1	Diretamente no leite	4,09 e 5,29	5d 4° C	Tayyarcán et al. (2023)
Leite cru	<i>P. mosselii</i>	ΦC106 e Φ21A	Diretamente no leite		4° C	Wongyoo et al. (2023)
Leite cru	<i>P. fluorescens</i> (3 log/ml)	UFJF_PfDIW6 e UFJF_PfSW6	Caldo Milk-PBE	3,2 log	7 dias (4° C) (pH 5 a 11)	Do Nascimento et al. (2022)

É possível observar que a maioria dos trabalhos publicados discutem o uso de fagos no controle de *L. monocytogenes*, enquanto a aplicação se dá pela superfície do queijo ou na aplicação no leite (matéria-prima). O uso de fagos no controle de *P. fluorescens* ainda é pouco discutido na literatura, assim como a influência da etapa de adição do fago durante a produção do queijo, por isso, este trabalho se torna um avanço à literatura sobre o uso de fagos na indústria de laticínios para tal finalidade.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MICRORGANISMOS

Neste estudo, foram utilizados uma estirpe de *P. fluorescens* (UFV 041), cedida pelo Banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (2004) e dois bacteriófagos líticos de *P. fluorescens* (*Purivirus* UFJF\_PfDIW6 e *Pijolavirus* UFJF\_PfSW6) do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) isolados e caracterizados previamente (DO NASCIMENTO; SABINO; DA ROZA CORGUINHA; TARGINO *et al.*, 2022; HUNGARO; VIDIGAL; DO NASCIMENTO; GOMES DA COSTA OLIVEIRA *et al.*, 2022; VIDIGAL; HUNGARO, 2023). Todos os microrganismos foram armazenados em caldo Tripton de Soja (TSB), contendo 20 % de glicerol como crioprotetor, e congelados a -80 °C. No momento da utilização, a bactéria foi ativada em caldo TSB por três repiques sucessivos, com incubação de 30 °C por 24h. Os bacteriófagos foram propagados a partir de estoques congelados a -80 °C conforme metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001).

Os fagos UFJF\_PfSW6 e UFJF\_PfDIW6, utilizados nesse estudo foram caracterizados anteriormente no trabalho de Nascimento *et al.* (2022). A caracterização indicou que ambos os fagos pertencem à ordem *Caudovirales* e provavelmente pertencentes à família *Podoviridae* mostrando uma cabeça icosaédrica presa a uma cauda curta. Além disso, apresentam genomas de DNA curtos que variam de 32 a 45 kb. O fago PfDIW6 mostrou um período latente de 115 min e um tamanho de explosão de 145 células PFU/infectadas. Enquanto o ciclo de infecção do fago \_PfSW6 foi apresentou período latente de 25 minutos e um tamanho de explosão de 25 PFU/célula infectada. Em relação à estabilidade do pH, ambos os fagos estavam estáveis a pH 5–11 e foram muito suscetíveis ao hipoclorito de sódio.

Quanto à eficiência dos fagos no biocontrole de *P. fluorescens*, nas temperaturas de 4 e 10°C, ambos apresentaram reduções na contagem bacteriana. À temperatura de 4°C, as reduções foram de 1,6 a 4,6 log UFC/ml e 1,4 a 4,1 log UFC/ml para UFJF\_PfDIW6 UFJF\_PfSW6, respectivamente. Já o experimento de armazenamento a 10 °C, a contagem bacteriana foi reduzida entre 0,1 e 3,1 log



UFC/ml e 0,2 a 5,4 log UFC/ml nas amostras tratadas com os fagos UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6, respectivamente.

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE BACTERÍOFAGOS EM SALMOURA

Para avaliar a possibilidade de aplicação dos bacteriófagos por inoculação dos queijos via salmoura, foi realizado um estudo de estabilidade. A salmoura foi preparada pela adição de 23% de NaCl em água purificada, seguido de esterilização em autoclave a 121 °C/15 min e, posterior adição de 0,30% de cloreto de cálcio em água purificada e ajuste de pH da salmoura para 5,3 com ácido láctico 85%. As suspensões de bacteriófagos foram preparadas de acordo com Nascimento (2020), nas concentrações de 10<sup>7</sup> PFU/mL (UFJFPfSW6) e 10<sup>9</sup> PFU/mL (UFJFPfDIW6) e adicionadas à salmoura e armazenada à 10 °C. Alíquotas de 100 µL da salmoura inoculada foram retiradas ao longo do tempo (0, 7, 14, e 21 e 28 dias), diluídas serialmente (1:10) em tampão SM (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub> ×7H<sub>2</sub>O, 0.01% gelatina), e avaliadas quanto à titulação dos bacteriófagos por meio de metodologia de microgotas em sobrecamada da bactéria hospedeira (ADAMS, 1959).

#### 4.3. DETERMINAÇÃO DA ETAPA DE ADIÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS NO PROCESSO PRODUTIVO

*P. fluorescens* UFV 041 foi cultivada *overnight* em caldo TSB a 30 °C, centrifugada (5.000 g por 5 min) e ressuspensa em solução de NaCl 0,85 %. Leite cru (100 mL) recém ordenhado foi aquecido a 60 °C por 30 min, para a eliminação e/ou redução de possíveis microrganismos contaminantes. Em seguida, o leite tratado termicamente foi resfriado a 30 °C e contaminado artificialmente com *P. fluorescens* UFV 041 para obter uma concentração final de células de 10<sup>4</sup> UFC/mL. Para avaliar o efeito da adição de bacteriófagos na redução de *P. fluorescens* em diferentes etapas do processo produtivo de QMF, foram preparados microqueijos (queijo com aproximadamente 3g) contaminados artificialmente seguindo a metodologia preconizada por Bachmann *et al.* (2009) com adaptações. Os bacteriófagos foram adicionados no leite (tratamento 1), massa (tratamento 2), ou processo de salga (tratamento 3) durante a fabricação do microqueijo. Amostras de microqueijo adicionadas de tampão SM foram utilizadas como controle para todas as três formas de adição.

Todo o leite contaminado com *P. fluorescens* foi adicionado de 1000  $\mu\text{L}$  de uma mistura dos bacteriófagos UFJF\_PfSW6 ( $10^6$  PFU/mL) e UFJF\_PfDIW6 ( $10^9$  PFU/mL) em tampão SM (tratamento 1) ou de 1000  $\mu\text{L}$  de tampão SM em substituição a suspensão de fagos (controle e tratamentos 2 e 3). Em seguida, o leite foi adicionado de cloreto de cálcio (100  $\mu\text{L}$  a 40%) e 100  $\mu\text{L}$  de coagulante líquido Ha-la® (Chr Hansen, Valinhos, SP) e, imediatamente homogeneizado, distribuído em tubos Falcon (10 mL/tubo), e incubado a 40 °C por 40 min para coagulação. Após coagulação, a coalhada foi cortada com o auxílio de alça bacteriológica descartável, deixada em repouso por 15 min e agitada suavemente por inversão 10 vezes com ciclos de repouso de 5 min entre as inversões. O soro de leite foi drenado por centrifugação (270 g por 5 min) e descartado. Posteriormente, alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  da suspensão de fagos (tratamento 2) ou 1000  $\mu\text{L}$  de tampão SM (controle, tratamento 1, 3) foram adicionadas aos tubos contendo a massa de microqueijo e misturadas com auxílio de alça bacteriológica descartável (Figura 5).

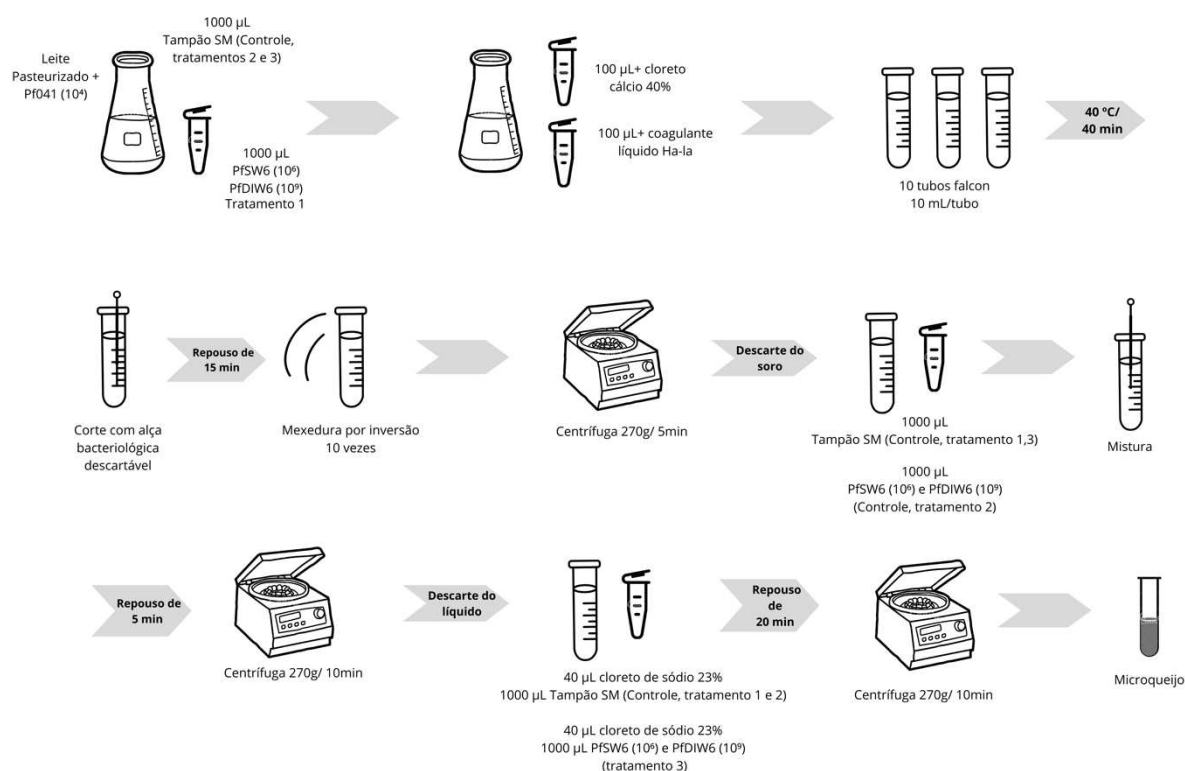


Figura 5: Esquema de produção do microqueijo com adição dos fagos UFJF\_PfSW6 e UFJF\_PfDIW6 em diferentes etapas do processo produtivo. Elaborado pelo autor.

A massa de microqueijo foi deixada em repouso por 5 min e, posteriormente, centrifugada (270 g por 10 min) para remoção do excesso de líquido e consolidação do microqueijo. A etapa de salga do microqueijo foi realizada por adição de 40  $\mu\text{L}$  de

solução estéril de cloreto de sódio 23 % (p/v), acrescida de 1000 µL de solução tampão SM (controle e tratamentos 1 e 2) ou de 1000 µL da suspensão de fagos (tratamento 3). Posteriormente, os microqueijos foram deixados em repouso por 20 min e, novamente, centrifugados (270 g por 10 min) para remoção do excesso de líquido. Os microqueijos foram armazenados a 10 °C e avaliados quanto à contagem de *Pseudomonas* e titulação de bacteriófagos em 0, 3, 7, 10, 15, 21 e 28 dias.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS BACTERIÓFAGOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL (*LARGE-SCALE*)

##### 4.4.1. Fabricação do queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal foi fabricado a partir de leite, obtido por ordenha mecânica, em uma propriedade rural na região de Juiz de Fora - MG. Um volume de 50 litros de leite foi pasteurizado a 63 °C por 30 min e resfriado a 37 °C. O leite pasteurizado e resfriado foi então contaminado com *P. fluorescens* UFV 041 cultivada *overnight* em caldo TSB a 30 °C, centrifugada (5.000 g; 5 min) e ressuspensa em solução de NaCl 0,85 % para obter concentração final de células de 10<sup>6</sup> UFC/ml ou 10<sup>3</sup> UFC/ml de leite. Em seguida, o leite foi adicionado de cloreto de cálcio (25 mL a 40%) e coagulante líquido Ha-Ia® Chr Hansen (40 mL) e, imediatamente homogeneizado. Após o tempo de coagulação de aproximadamente 40 min, a coalhada foi cortada e iniciou-se o processo de mexedura, com intervalos de agitação e repouso de 5 min. Após um período de 30 min de mexedura, os grãos da massa apresentaram consistência adequada para a enformagem.

Na enformagem, parte do soro de leite foi retirada do tanque de fabricação para facilitar o enchimento das formas (250 g). Os queijos enformados foram armazenados sob refrigeração a 10 °C e virados após 1 e 24 h. Após as 24 h de armazenamento refrigerado, os queijos foram desenformados e salgados por 30 min em salmoura contendo ou não bacteriófagos. A salmoura foi preparada e contaminada previamente com os bacteriófagos UFJF\_PfSW6 e UFJF\_PfDIW6 nas concentrações de 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> PFU/mL, respectivamente. Os queijos foram embalados em embalagem de polipropileno, armazenados a 10 °C ou a 4 °C e avaliados quanto à contagem de *Pseudomonas*, titulação de bacteriófagos, determinação dos índices de extensão e profundidade e grau de lipólise durante 0, 3, 7, 14, e 21 e 28 dias.

#### 4.4.2. Análise Microbiológica

As amostras de queijo Minas Frescal foram pesadas (25 g) e diluídas serialmente (1:10) em água peptonada tamponada 0,1%. Para contagem de *P. fluorescens* as diluições foram inoculadas em ágar *Pseudomonas* suplementado com CFC (Cetrimida: 0,01 mg mL<sup>-1</sup>; Fucidin: 0,01 mg mL<sup>-1</sup>; cefalosporina: 0,05 mg mL<sup>-1</sup>), por plaqueamento em superfície e incubadas a 30 °C por 48 h. As titulações dos bacteriófagos nas amostras de QMF foram realizadas a partir da centrifugação (10.000 g por 10 min) da diluição 10<sup>-1</sup>, seguida de diluições decimais seriadas em tampão SM (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub> ×7H<sub>2</sub>O, 0.01% gelatina) e titulação conforme metodologia descrita por Adams (1959). Alíquotas de 20 µL das diluições foram dispostas em placas de Petri contendo sobrecamada de bactéria hospedeira em ágar TSA semi-sólido e incubadas a 30 °C por 24 h.

#### 4.4.3. Análise das frações de nitrogênio e determinação do grau de proteólise

Os teores de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio não proteico solúvel em ácido tricloroacético 12% foram determinados pelo método de Kjeldahl conforme metodologia de Silva et al. (1997). Esses valores foram utilizados nos cálculos dos índices de extensão e profundidade das amostras de queijo (FURTADO; PARTRIDGE, 1988; WOLFSCHOON POMBO, 1983). Esses índices foram utilizados para determinar o grau de proteólise ao longo do armazenamento nas amostras de queijo Minas Frescal contaminadas com *Pseudomonas* e tratadas ou não com bacteriófagos.

O grau de lipólise nas amostras foi avaliado indiretamente por meio da determinação da acidez titulável da gordura extraída do queijo, medida em mg KOH/g de gordura, ao longo do período de armazenamento. Brevemente, aproximadamente 40 g de amostra de queijo foram macerados com 12 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro em almofariz de porcelana e transferidos com 60 mL de éter dietílico para um frasco de 100 mL com tampa de rosca. A mistura foi agitada por 1 h, com intervalos de ultrassonificação por 30s a cada 15 min. Posteriormente, a mistura foi decantada e o sobrenadante filtrado em papel de filtro qualitativo. O precipitado remanescente no frasco foi ressuspenso em três porções sucessivas de 20 mL de éter dietílico, que foi, posteriormente, decantado e filtrado. O solvente total recolhido foi evaporado em equipamento Extrator de Soxhlet. Após a evaporação, a fase lipídica foi quantificada, dissolvida em 50 mL

de Etanol/Éter dietílico (1:2) e titulada com solução etanólica de KOH 0,05 N com fenolftaleína 1% (p/v) como indicador. O resultado foi expresso em mg de KOH gasto para neutralizar um grama de gordura.

#### 4.5. SOBREVIVÊNCIA DE *P. FLUORESCENS* EM SALMOURA ADICIONADA OU NÃO DE BACTERÍOFAGOS

*P. fluorescens* UFV 041 foi cultivada *overnight* em caldo TSB a 30 °C, centrifugada (5.000 g por 5 min) e ressuspensa em solução de NaCl 0,85 %. Salmouras adicionadas ou não de bacteriófagos (UFJF\_PfSW6- 10<sup>7</sup> PFU/mL e UFJF\_PfDIW6 - 10<sup>9</sup> PFU/mL) preparadas conforme descrito previamente (item 4.2) foram contaminadas com *P. fluorescens* UFV 041 para obter concentração final de células de 10<sup>6</sup> UFC/mL e armazenadas a 10 °C. Alíquotas de 100 µL de salmoura contaminada com e sem adição de bacteriófagos foram coletadas nos dias 0, 2, 6, 8, 10, 15, 22 e 30, posteriormente foram diluídas serialmente (1:10) em água peptonada tamponada 0,1%, e avaliadas quanto a contagem de *Pseudomonas* por meio de plaqueamento em superfície em ágar *Pseudomonas* suplementado com CFC (Cetrimida: 0,01 mg mL<sup>-1</sup>; Fucidin: 0,01 mg mL<sup>-1</sup>; cefalosporina: 0,05 mg mL<sup>-1</sup>).

#### 4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi realizado em triplicata e a estabilidade dos fagos na salmoura foi avaliada por teste ANOVA ao nível de significância de 5%. Os resultados de contagem de *P. fluorescens*, grau de lipólise (mg KOH/g de gordura) e proteólise (índices de profundidade e de extensão) das amostras de queijo tratadas ou não com bacteriófagos foram comparados por meio de teste *t-Student* ao nível de significância de 5%, em cada um dos tempos de armazenamento avaliados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ESTABILIDADE DOS BACTERIÓFAGOS EM SALMOURA

As titulações dos dois bacteriófagos mantiveram-se inalteradas em salmoura (23% de NaCl, 0,30% de CaCl<sub>2</sub>, e pH 5,3) durante 28 dias de armazenamento a 10 °C (Tabela 5). As concentrações dos bacteriófagos UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6 permaneceram em torno de 7,0 e 4,9 Log PFU/mL, respectivamente. A variação entre as titulações iniciais dos dois bacteriófagos ocorreu devido a diferenças nas titulações máximas alcançadas durante a propagação de cada um deles. O bacteriófago UFJF\_PfSW6 atingiu titulações 100 vezes menores que aquelas do bacteriófago UFJF\_PfDIW6 na propagação seguindo a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). Neste ensaio foram utilizadas as concentrações máximas obtidas para cada bacteriófago na inoculação da salmoura.

Tabela 5: Titulação de bacteriófagos adicionados em salmoura e armazenados a 10 °C durante 28 dias.

Tempo (dias)	Titulação bacteriófagos (PFU/mL)	
	UFJF_PfDIW6*	UFJF_PfSW6*
0	7,06 ± 0,10	4,90 ± 0,05
7	7,13 ± 0,08	4,90 ± 0,12
14	6,90 ± 0,11	4,87 ± 0,04
21	7,11 ± 0,03	4,68 ± 0,17
28	7,17 ± 0,03	4,87 ± 0,06

\* Concentração de ambos os bacteriófagos não diferiu estatisticamente pela ANOVA ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo de armazenamento.

Diversos fatores físicos e químicos, como temperatura, acidez, salinidade e íons, podem determinar a ocorrência e viabilidade de bacteriófagos no ambiente e durante o armazenamento, principalmente, por danificar seus elementos estruturais e reduzir a infectividade (ACKERMANN; TREMBLAY; MOINEAU, 2004). Apesar disso, os fagos são ubíquos e já foram isolados de diversos ambientes com condições estressantes. Fagos já foram encontrados em ambientes com alta irradiação UV e calor como o deserto do Saara ou em fontes termais, em condições adversas de pH e forças iônicas, como em esgoto, em alimentos, em humanos e em fábricas de queijo (BACHRACH; LEIZEROVICI-ZIGMOND; ZLOTKIN; NAOR *et al.*, 2003; BREITBART; WEGLEY; LEEDS; SCHOENFELD *et al.*, 2004; BRUTTIN; DESIERE; D'AMICO; GUÉRIN *et al.*, 1997; HAVELAAR; HOGEBOM, 1984; PRIGENT; LEROY; CONFALONIERI; DUTERTRE *et al.*, 2005). No presente estudo, ambos os fagos

foram estáveis, suportaram a salinidade e o pH em salmoura armazenada refrigerada durante 28 dias, o que permitiu sua adição ao QMF a partir da salga em salmoura.

A estabilidade do fago em ambientes salinos também foi observada por outros autores. Hidaka (1971) observou maior atividade de fagos de *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Flavobacterium* em solução com concentrações de NaCl semelhantes à água do mar, aproximadamente 3,5%. Seaman e Day (2007) observaram fagos de *Staphylococcus aureus* estáveis em águas com salinidade entre 4 e 37% de NaCl. Scarascia *et al.* (2018) observaram a efetividade de fagos no tratamento de *P. aeruginosa* em solução salina de NaCl na concentração de 3,5%. Fister *et al.* (2016) ao analisarem a influência do meio salino na estabilidade de fagos P100 e sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes* foram inicialmente capazes de reduzir as bactérias até 7 log em até 14 dias a 4 °C. Em concentrações de NaCl de até 0,1 M, um aumento de fagos livres no sobrenadante foi observado após 30 minutos. Enquanto Leibo e Mazur (1969) observaram que a diluição rápida ou excessiva da concentração de NaCl da solução salina (de 0,3 para 0,05 M), causou uma diminuição na viabilidade ou até mesmo inativação dos fagos avaliados.

As condições de acidez do meio também afetam diretamente a infectividade de fagos (LY-CHATAIN, 2014; MAURA; DEBARBIEUX, 2011). Fister *et al.* (2016) ao analisarem a influência do pH na efetividade de bacteriófagos P100 contra *Listeria monocytogenes*, observaram que em pH 2 e 3 a infectividade de fagos foi reduzida rapidamente, enquanto os fagos se mantiveram estáveis entre pH 4 e 10. Em outro estudo, Kerby *et al.* (KERBY; GOWDY; DILLON; DILLON *et al.*, 1949) indicaram o pH ótimo entre 6 e 8 para infectividade de fagos do tipo T7. Já Sharp *et al.* (1946) ao analisarem fagos do tipo T2, observaram estabilidade na faixa de pH entre 5 e 9, com máximo entre 5 e 6. Kłak *et al.* (2011) observaram a estabilidade de fago do tipo T4 em pH entre 6 e 7,4. Zaburlin *et al.* (2017) e Mercanti *et al.* (2016) afirmam que a infectividade de diversos fagos é severamente prejudicada em pH inferiores a 5. Nesse estudo, os fagos UFJF\_PfSW6 e UFJF\_PfDIW6 se mantiveram estáveis no pH de 5,3, resultados também observados por Nascimento *et al.* (2020). Portanto, a salmoura também pode ser considerada um reservatório de fagos com capacidade de infectar bactérias durante o momento da salga (NEVE; DIETRICH; HELLER, 2005).

## 5.2. DETERMINAÇÃO DA ETAPA DE ADIÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS NO PROCESSO PRODUTIVO

As contagens de *P. fluorescens* UFV 041 ao longo de 28 dias de armazenamento em microqueijos adicionados de bacteriófagos em diferentes etapas do processo produtivo (leite, massa ou salga) são apresentadas na Figura 6A. *P. fluorescens* cresceu rapidamente nos microqueijos adicionados ou não de bacteriófagos, e atingiu a fase estacionária, com aproximadamente  $10^8$  UFC/g, em torno de 7 dias de armazenamento da  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Efeito significativo de redução na contagem de *P. fluorescens* ( $p < 0,05$ ) entre microqueijos adicionados de bacteriófagos em comparação com o controle positivo sem adição de bacteriófagos foi observado apenas em 3 dias de armazenamento por meio do Teste *t* de *Holm-Sidak*. Nos demais tempos de estudo não houve diferença entre controle positivo e tratamento com bacteriófagos independente da etapa de aplicação dos bacteriófagos. A redução na contagem de *P. fluorescens* não foi influenciada pela etapa de adição dos bacteriófagos (leite, massa ou salga) no processo de fabricação em nenhum dos tempos avaliados, com exceção de 15 dias de armazenamento (Figura 6B). Houve diminuição no biocontrole ao longo do experimento. As maiores reduções na contagem de *Pseudomonas* foram observadas com três primeiros dias de armazenamento (1,1 a 1,5 Log UFC/g), já no vigésimo oitavo dia, as reduções variaram de 0,1 a 0,2 Log UFC/g. Outro fator importante a ser discutido é a influência das fases de crescimento da bactéria na infectividade e replicação dos fagos. A maior atividade dos fagos ocorreu após o terceiro dia de experimento, na fase exponencial do cultivo microbiano.

Em relação à aplicação de fagos em queijo, Guenther et al. (2009) afirmaram que a eficácia dos fagos depende em grande parte da estrutura da matriz alimentar. Portanto, o estado físico do alimento desempenha um papel significativo na eficácia do fago. Durante a fabricação do queijo, as microestruturas do leite são alteradas e afetam a atividade do fago, o que pode explicar a ausência diferença de redução de bactérias entre as etapas de adição em leite e no queijo, pois o tempo em que o leite fica líquido é muito curto, em torno de 40 min até a completa coagulação (EL-BAKRY; SANCHEZ; MEHTA, 2018).

Entretanto, estudos anteriores indicam maiores taxas de redução de bactérias indesejáveis quando os fagos foram aplicados diretamente ao leite durante a



fabricação de queijo em comparação com sua aplicação na superfície do queijo após a fabricação (GARCÍA-ANAYA; SEPULVEDA; SÁENZ-MENDOZA; RIOS-VELASCO *et al.*, 2020). Silva *et al.* (2014) observaram redução de 1 log de *L. monocytogenes* na aplicação de fago em superfície de queijo macio. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Guenther e Loessner (2011), que observaram que a aplicação de fago em superfície reduziu em 1 log a contagem de *L. monocytogenes*.

Nenhuma consideração foi reportada sobre como as mudanças de fase nos produtos lácteos afetam a eficácia do fago (GARCÍA-ANAYA; SEPULVEDA; SÁENZ-MENDOZA; RIOS-VELASCO *et al.*, 2020). Além disso, a aplicação de fagos na etapa de salga em salmoura para controle de bactérias em queijos ainda não foi reportada na literatura até o momento.

Em estudo feito por Nabergoj, Modic e Podgornik (2019) verificou-se um aumento do período de latência e redução do *burst size* (número de partículas fágicas da progênie liberadas por célula infectada) 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 em que as células infectadas permanecem viáveis, mas não se dividem, interrompendo assim, o desenvolvimento dos bacteriófagos. Além disso, alterações na membrana da bactéria durante a fase estacionária reduzem a adsorção dos bacteriófagos e, conseqüentemente, a sua infectividade.

Considerando que não houve diferença na redução da contagem bacteriana entre as formas de aplicação foi elaborado um gráfico representando o efeito geral da redução da contagem de *Pseudomonas* pela aplicação de bacteriófagos (Figura 6C).

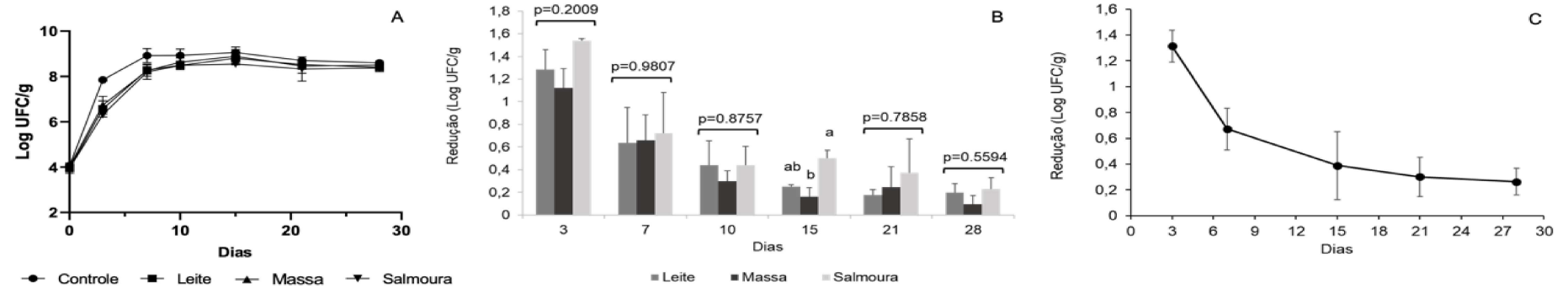


Figura 6 (A): Contagem de *Pseudomonas* ao longo de 28 dias de armazenamento em microqueijos adicionados de bacteriófagos em diferentes etapas do processo produtivo (leite, massa ou salga). Linha pontilhada vermelha indica que houve diferença estatística significativa pelo Teste *t* de Holm-Sidak com nível de significância de 5% entre tratamento e controle. (B): Efeito de redução da contagem de *Pseudomonas* pela adição de fagos no leite, na massa ou na salmoura na fabricação de microqueijo ao longo de 28 dias de armazenamento. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (C): Efeito geral de redução da contagem de *Pseudomonas* ao longo de 28 dias de armazenamento independente da etapa de adição dos fagos na fabricação de microqueijo.

### 5.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS BACTERIÓFAGOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL AO LONGO DO ARMAZENAMENTO (*LARGE-SCALE*)

#### 5.3.1. Efeito dos bacteriófagos sobre a contagem bacteriana em queijo Minas Frescal

A eficácia da interação entre fagos e bactérias é determinada por diversos fatores, como por exemplo a multiplicidade de infecção (MOI), as características da matriz alimentar e as condições ambientais. Cada sistema alimentar tem propriedades físico-químicas únicas que podem interferir no tratamento com fagos (GUENTHER; HUWYLER; RICHARD; LOESSNER, 2009). A temperatura é um fator externo que influencia na estabilidade e infectividade de fagos (NASSER; OMAN, 1999; OLSON; AXLER; HICKS, 2004). Jepson e March (2004) observaram que um fago analisado por eles (fago  $\lambda$ ) apresentou boa estabilidade a 4 °C. Enquanto Machalela (2016), ao avaliar a estabilidade de bacteriófagos de *P. fluorescens* a -20 °C, 10 °C e 24 °C, observou que a 10 °C houve perda de viabilidade do fago de  $1,02 \pm 0,1$  Log PFU/mL. O presente estudo avaliou a infecção dos fagos a 4 e 10 °C, simulando condições de armazenamento aplicáveis em ambiente industrial, comércio e residências.

Outro fator que influencia a atividade fágica em produtos lácteos é a MOI. El-Haddad et al. (2016) testaram o efeito de coquetéis de fagos na redução de *S. aureus* em coalhada. A redução de bactérias foi de aproximadamente 1,0, 2,0 e 3,0 Log UFC/g em MOIs de 15, 45 e 150, respectivamente, indicando que a MOI é um fator importante na interação fago-bactéria. Garcia *et al.* (2007), ao estudarem a eficiência de um coquetel de fagos sobre estirpes de *S. aureus*, observaram que MOIs de 350 e 250 reduziram em 6,5 e 7,2 Log a contagem de bactérias em leite pasteurizado, respectivamente.

A adição dos fagos, independente da carga microbiana inicial, não foi capaz de provocar grandes reduções na contagem de *P. fluorescens* no QMF. A 10 °C e alta carga bacteriana as reduções variaram de 0,2 a 0,6 log UFC/g. Já a 10 °C baixa carga bacteriana as reduções variaram de 0,1 a 0,3 log UFC/g. Com exceção da aplicação a 4 °C e baixa carga de bactérias e 3 dias de armazenamento, a carga inicial e a temperatura de aplicação do tratamento não interferiram no controle de crescimento bacteriano, reduzindo as contagens em apenas 0,5 a 0,6 Log UFC/g (Figura 7A). Esse resultado pode ser atribuído à baixa infectividade dos fagos a temperatura de 10 °C.

A contaminação artificial do leite pasteurizado utilizado na fabricação dos queijos com *P. fluorescens* UFV 041 ( $10^4$  UFC/mL) levou a contagens iniciais elevadas nas amostras de queijo, de aproximadamente 7 Log UFC/g. As amostras de queijo tratadas com bacteriófagos atingiram titulações iniciais desses agentes de aproximadamente 6 Log PFU/g. A bactéria *P. fluorescens* UFV 041 cresceu rapidamente nas amostras de queijo, atingindo contagens de 9 Log UFC/g já nos sete primeiros dias de armazenamento a 10 °C e se manteve elevada até o final do experimento de 28 dias.

Em relação à redução da contagem de bactérias (Figura 7B), as amostras inoculadas com fagos resultaram em uma ligeira diminuição na contagem de *P. fluorescens* até o terceiro dia de experimento, depois, o fago não foi capaz de diminuir a contagem de bactérias, a maior redução ocorreu em 4 °C e baixa carga de bactérias e em 3 dias de armazenamento. Os resultados observados indicam que não houve influência da temperatura para o controle bacteriano ao longo do tempo. Marrella *et al.* (2022) também observou o aumento de *P. fluorescens* em amostras de queijo sob refrigeração e que a inoculação do fago gerou pequenas diminuições na contagem bacteriana, mas não significativas ao longo do tempo. O crescimento de *Pseudomonas* spp. a um nível tão alto quanto os encontrados neste estudo afeta negativamente as propriedades sensoriais do produto e representa o principal obstáculo para prolongar a vida útil de produtos lácteos (LERICHE; BORDESSOULES; FAYOLLE; KAROUI *et al.*, 2004; PALA; SCARANO; VENUSTI; SARDO *et al.*, 2016; SPANU; PIRAS; MOCCI; NIEDDU *et al.*, 2018).

A contagem de *P. fluorescens* aumentou nas amostras de controle ao longo do tempo, atingindo uma contagem superior a 8 Log UFC/g após 7 dias e permanecendo estável até o final do experimento. Já a titulação dos fagos foi influenciada pela temperatura até o sétimo dia, apresentando maiores valores para o experimento a 10 °C (8,1 e 7,9 Log UFP/g para alta e baixa carga inicial, respectivamente) e menor para 4 °C e carga inicial baixa (6,9 Log UFP/g) (Figura 7C). Após o décimo quarto dia, não houve diferença entre as titulações.

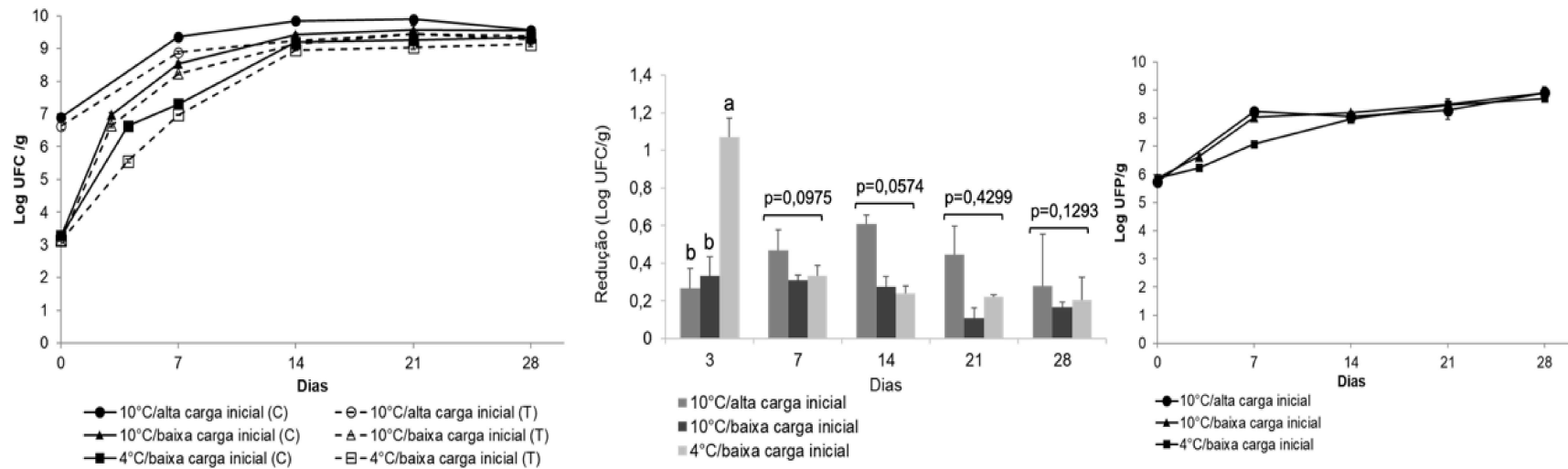


Figura 7A: Contagem de *Pseudomonas* ao longo do tempo nas três condições de aplicação dos fagos (armazenamento a 10 °C e carga inicial alta; armazenamento a 10 °C e carga inicial baixa; armazenamento a 4 °C e carga inicial baixa). (B): Redução na contagem de *Pseudomonas* ao longo do tempo nas três condições de aplicação dos fagos. (C): Titulação de fagos ao longo do tempo nas três condições de aplicação.

Esses resultados confirmam a influência da temperatura na infectividade de fagos. Do Nascimento (2020), também avaliou a influência da temperatura na interação fago-bactéria. Ao estudar a atividade de fagos de *P. fluorescens* a 4 °C e 10 °C, observou-se que as reduções na contagem de bactérias foram maiores a 4 °C.

### 5.3.2. Influência da adição de bacteriófagos sobre a proteólise e a lipólise no queijo Minas Frescal

Mesmo nas condições ideais de temperatura (conservação a 4°C), observou-se crescimento exponencial da bactéria, o que indica que a refrigeração não é suficiente para resolver o problema. Ademais, o tratamento com os bacteriófagos não foi capaz de diminuir o crescimento de *P. fluorescens*, o que indica a baixa efetividade dos fagos sobre a contagem de bactérias e, conseqüentemente, na redução da deterioração do QMF.

A produção e/ou atividade de proteases produzidas pelas bactérias, para as temperaturas avaliadas, não foi influenciada pelos fagos (Figura 8). A presença dessas enzimas no queijo pode acarretar alterações como a rancidez, alteração de cor, amargor e sabores maltados ou metálicos, (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; GLÜCK; RENTSCHLER; KREWINKEL; MERZ *et al.*, 2016).

As amostras de queijo contaminadas apresentaram uma rápida degradação de proteínas, demonstrada pela variação no índice de extensão de 3,2 a 27,7% e no índice de profundidade de 1,6 a 20,9%, durante 28 dias de armazenamento a 10 °C e alta carga bacteriana inicial, respectivamente. Para a temperatura de 4 °C, os valores foram de 1,7 a 20,9% e 4,1 a 24,4% para profundidade e extensão, respectivamente. A atividade proteolítica de *P. fluorescens* com e sem adição dos bacteriófagos foi elevada ao longo do experimento, o que indica bactéria altamente proteolítica nas condições avaliadas. Estudos sobre vida de prateleira de queijo Minas Frescal indicam aumento nos índices de extensão das amostras variando de 9,9 a 13% ao final de 20 a 30 dias de armazenamento a 4 e 10 °C (ANDREATTA, 2006; SANGALETTI, 2007).

Em relação ao grau de lipólise, observou-se o aumento da degradação de lipídios do queijo ao longo do armazenamento. O consumo de hidróxido de potássio aumentou de 0,47 a 3,9 mg de KOH/g de gordura a 10 °C e carga bacteriana baixa, 0,48 a 2,7 mg de KOH/g de gordura a 10 °C e carga bacteriana alta e 0,48 a 2,7 mg de KOH/g de gordura a 4 °C e carga bacteriana baixa, nos 28 dias de armazenamento. As amostras tratadas com bacteriófagos apresentaram resultados bastante similares aos do controle positivo, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) apenas ao final de 28 dias de armazenamento.

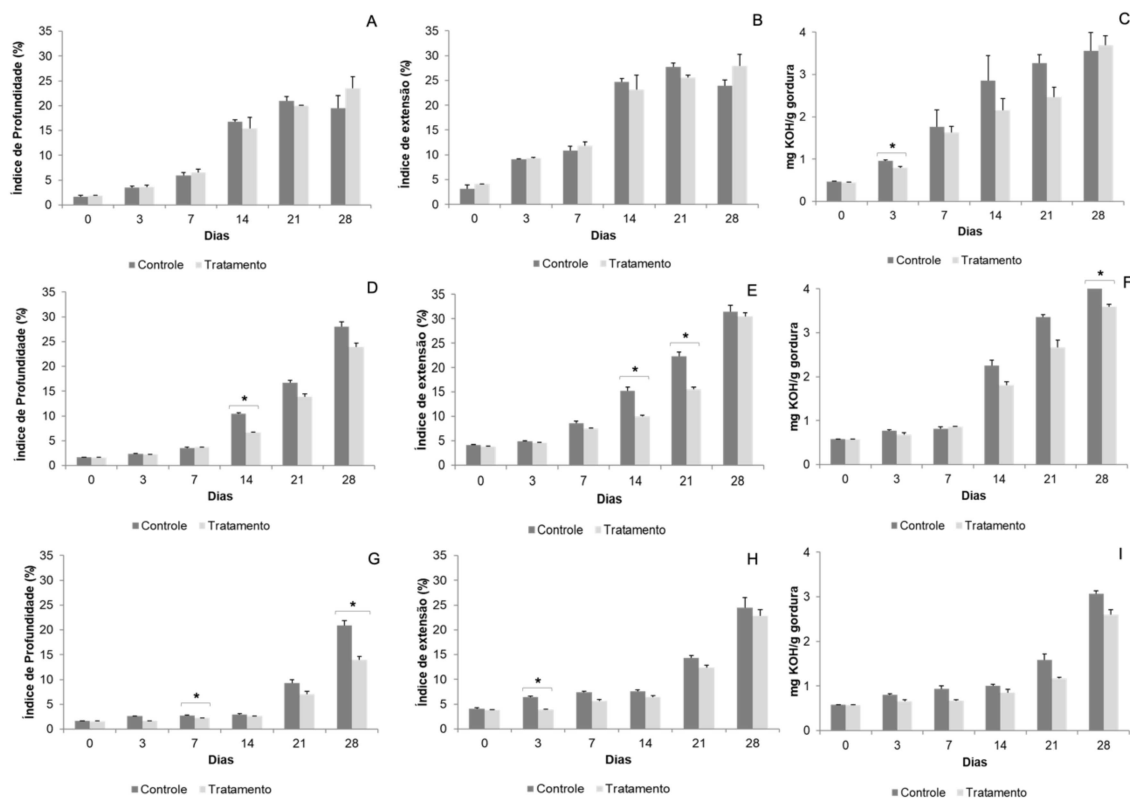


Figura 8: Efeito dos fagos UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6 na redução de contagem de *P. fluorescens* UFV 041 em queijo Minas Frescal durante os 28 dias de armazenamento a 10 °C e carga inicial MOI alta (A, B e C), a e 10 °C e carga inicial MOI baixa (D, E e F) e a 4 °C e carga inicial baixa (G, H e I). Grau de lipólise medido em mg de KOH gastos para neutralizar um grama de gordura de queijo Minas Frescal. (\*) = diferença estatística significativa.

#### 5.4. EFEITO DO FAGO NA CONTAMINAÇÃO DA SALMOURA

Na salmoura contaminada por *P. fluorescens* e tratada com solução dos fagos, a contagem da bactéria reduziu ao longo do tempo pelo efeito de estresse osmótico, nutritivo e de pH. Entretanto, a contagem ainda foi de 2,38 Log UFC/mL depois de 40 dias de armazenamento (Figura 9), o que aumenta o risco de contaminação cruzada de *P. fluorescens* em queijos via salmoura. Os fagos não atuaram na redução da contagem bacteriana na salmoura. Santos (1991) ao estudar a influência dos fatores externos como pH, temperatura e salinidade, observou que o aumento da concentração de NaCl de 0,1 M para 1 M, reduziu em 20% a contagem de fagos. Smrekar *et al.* (2008) observaram que a infectividade do fago do tipo T4 foi essencialmente estável na faixa de pH 4–10 e concentração de NaCl entre 0,1 M e 1,5 M, enquanto a concentração de 2 M de NaCl diminuiu a infectividade. Zachary

(1976) ao examinar os efeitos da variação nos níveis iônicos na estabilidade e replicação de dois bacteriófagos (nt-1 e nt-6), observou que a replicabilidade dos fagos foi influenciada por diferentes concentrações de NaCl. Como não foi realizado um estudo sobre a faixa iônica ótima para os fagos analisados, a concentração de NaCl da salmoura pode ter influenciado negativamente na replicabilidade dos bacteriófagos.

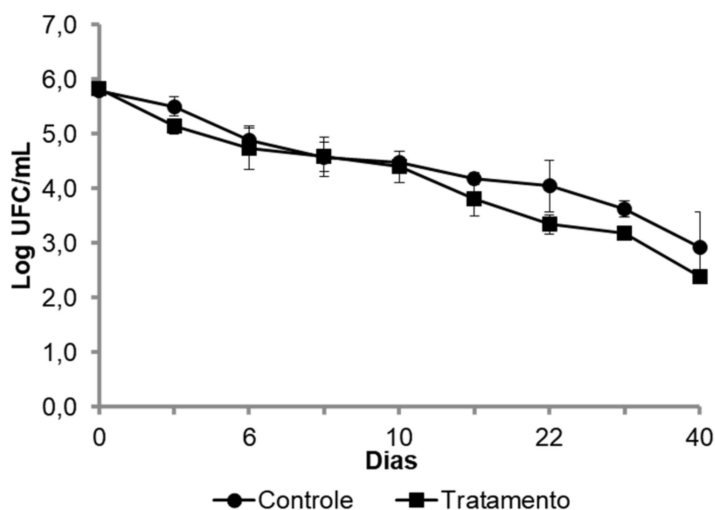


Figura 9: Efeito do fago na contagem de *P. fluorescens* na salmoura refrigerada a 10°C durante os 40 dias de experimento.



## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo, os dois bacteriófagos avaliados (UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6) foram estáveis em salmoura e mantiveram a capacidade de infecção e a sua concentração ao longo de 28 dias de armazenamento a 4 °C, o que permitiu sua aplicação em QMF na etapa de salga por salmoura. Entretanto, a forma de adição dos fagos no QMF, seja no leite, massa ou salmoura, não levou a diferenças estatísticas significativas nas contagens de *Pseudomonas* entre si. As diferenças foram observadas apenas em relação ao controle positivo, sem adição de fagos, aos 3 dias de armazenamento. No experimento, as bactérias foram capazes de crescer e deteriorar QMF mesmo em temperaturas de refrigeração 10 °C e 4 °C, atingindo elevada contagem em um curto período de tempo de armazenamento tanto em alta quanto baixa carga bacteriana inicial de inóculo. A adição de fagos não foi capaz de reduzir de forma efetiva a contagem de *P. fluorescens* nos queijos e, conseqüentemente, não interferiu no processo de deterioração. Além disso, essa bactéria foi capaz de sobreviver em salmoura por 40 dias a 10 °C, apesar da redução de 3,3 Log UFC/mL ao longo do tempo na contagem inicialmente inoculada. Os fagos também não foram capazes de reduzir a contagem bacteriana em salmoura, indicando a ineficiência dos fagos nessa proposta de controle microbiológico.

Apesar da etapa de adição do fago não ter influenciado na redução da contagem de bactérias, a aplicação do fago na salmoura, pode trazer benefícios econômicos na produção desse tipo de queijo. É possível que o estado físico da matriz alimentar tenha influenciado a atividade dos fagos. Portanto, pesquisas futuras devem ser realizadas para avaliar a interação fago-bactéria com carga bacteriana inicial mais baixa e avaliar a influência da matriz alimentar na infecção dos fagos ao longo do tempo de armazenamento refrigerado.

## REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T. Phage therapy dosing: The problem (s) with multiplicity of infection (MOI). **Bacteriophage**, 6, n. 3, p. e1220348, 2016.

ACKERMANN, H.-W.; TREMBLAY, D.; MOINEAU, S. Long-term bacteriophage preservation. **WFCC NewsI**, 38, p. 35-40, 2004.

ADAMS, M. H. Bacteriophages. **Bacteriophages.**, 1959.

AGRO, P. S. O mercado de queijos finos. 2023.

ANDREATTA, E. **Avaliação da qualidade dos queijos Minas frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. 2006. -, Universidade de São Paulo.

ARUMUGAM, S. N.; MANOHAR, P.; SUKUMARAN, S.; SADAGOPAN, S. *et al.* Antibacterial efficacy of lytic phages against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in bacteraemia mice models. **BMC microbiology**, 22, n. 1, p. 187, 2022.

AYALA TABARES, A. Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos líticos no biocontrole de *Campylobacter jejuni*. 2016.

BACHRACH, G.; LEIZEROVICI-ZIGMOND, M.; ZLOTKIN, A.; NAOR, R. *et al.* Bacteriophage isolation from human saliva. **Letters in applied microbiology**, 36, n. 1, p. 50-53, 2003.

BARAN, A.; ERDOĞAN, A.; TURGUT, T.; ADIGÜZEL, M. C. A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. **Turkish Journal of Nature and Science**, 6, n. 2, p. 100-105, 2017.

BARUKČIĆ, I.; ŠČETAR, M.; MARASOVIĆ, I.; LISAK JAKOPOVIĆ, K. *et al.* Evaluation of quality parameters and shelf life of fresh cheese packed under modified atmosphere. **Journal of food science and technology**, 57, p. 2722-2731, 2020.

BARUZZI, F.; LAGONIGRO, R.; QUINTIERI, L.; MOREA, M. *et al.* Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. **Food Microbiology**, 30, n. 1, p. 37-44, 2012.

BERTOZZI SILVA, J.; STORMS, Z.; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. **FEMS microbiology letters**, 363, n. 4, p. fnw002, 2016.

BOLSAN, A. C. **Prospecção de bacteriófagos para o controle de bactérias heterotróficas e nitratantes no processo de desamonificação em efluentes ricos em nitrogênio**. 2023. -, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

BRASIL. Portaria no 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 março 1996. pp. 3977.

BRASIL. **DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017**. 2017.

BREITBART, M.; WEGLEY, L.; LEEDS, S.; SCHOENFELD, T. *et al.* Phage community dynamics in hot springs. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, n. 3, p. 1633-1640, 2004.

BROWN, S. R.; MILLÁN-BORRERO, N. C.; CARBONELLA, J. C.; MICHELETTI, A. J. *et al.* Acidification of model cheese brines to control *Listeria monocytogenes*. **Journal of food protection**, 81, n. 1, p. 79-83, 2018.

BRUTTIN, A.; DESIERE, F.; D'AMICO, N.; GUÉRIN, J.-P. *et al.* Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. **Applied and environmental microbiology**, 63, n. 8, p. 3144-3150, 1997.

CAMPOS, N. D. C. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal, comercializados em Botucatu, SP. 2022.

CARMINATI, D.; BONVINI, B.; ROSSETTI, L.; ZAGO, M. *et al.* Investigation on the presence of blue pigment-producing *Pseudomonas* strains along a production line of fresh mozzarella cheese. **Food Control**, 100, p. 321-328, 2019.

CARRASCOSA, C.; MARTÍNEZ, R.; SANJUÁN, E.; MILLÁN, R. *et al.* Identification of the *Pseudomonas fluorescens* group as being responsible for blue pigment on fresh cheese. **Journal of Dairy Science**, 104, n. 6, p. 6548-6558, 2021.

CARVALHO, G.; DA ROCHA, D.; CARNEIRO, A. V. INDICADORES: LEITE E DERIVADOS, v. 9, n. 83, 2018. 2018.

CASTRO, M. S. R.; DA SILVA FERNANDES, M.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Modelling *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on stainless steel surfaces and controlling through sanitisers. **International Dairy Journal**, 114, p. 104945, 2021.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P.; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. D. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, 39, n. 6, p. 77-88, 2009.

CHANG, Y. Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety. **Microorganisms**, 8, n. 5, p. 724, 2020.

CHRISTAKI, S.; MOSCHAKIS, T.; KYRIAKOUDI, A.; BILIADERIS, C. G. *et al.* Recent advances in plant essential oils and extracts: Delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. **Trends in Food Science & Technology**, 116, p. 264-278, 2021.

CISEK, A. A.; DĄBROWSKA, I.; GREGORCZYK, K. P.; WYŻEWSKI, Z. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. **Current microbiology**, 74, p. 277-283, 2017.

CORSETTI, A.; ROSSI, J.; GOBBETTI, M. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. **International journal of food microbiology**, 69, n. 1-2, p. 1-10, 2001.

COSTA, M. J.; PASTRANA, L. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILLANKORVA, S. M. *et al.* Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives. **Viruses**, 15, n. 6, p. 1271, 2023.

CRESPO-PIAZUELO, D.; LAWLOR, P. G. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. **Irish Veterinary Journal**, 74, p. 1-12, 2021.

DA CONCEIÇÃO, A. C.; DA SILVA, M. R.; DE OLIVEIRA, V. S.; SOARES, B. G. *et al.* Avaliação da utilização de cloreto de cálcio em substituição ao ácido láctico para fabricação de. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 64, n. 369, p. 32-38, 2009.

DA SILVA COSTA, N. A.; DA SILVA RODRIGUES, R.; DE CARVALHO, A. F.; MACHADO, S. G. Formação de biofilme e produção de pigmento azul por *Pseudomonas*: o impacto na indústria de lácteos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, 8, n. 8, p. 14898-14801e, 2022.

DA SILVA, L. O. P.; DA ROCHA NOGUEIRA, J. M. Uso de bacteriófagos como alternativa no controle de infecções bacterianas. **Research, Society and Development**, 11, n. 11, p. e200111133619-e200111133619, 2022.

DA SILVA RODRIGUES, R.; MACHADO, S. G.; DE CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. *Pseudomonas* sp. as the causative agent of anomalous blue discoloration in Brazilian fresh soft cheese (Minas Frescal). **International Dairy Journal**, 117, p. 105020, 2021.

DAVIS, C.; SILVEIRA, N.; FLEET, G. H. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. **Applied and Environmental Microbiology**, 50, n. 4, p. 872-876, 1985.

DCI, D. D. C. I. E. S.-. **Produção de queijo deve crescer 2,5% neste ano com aumento do consumo.** . 2018. Acesso em: 20/06/2023.

DE ANDRADE PAULO, I.; MONTANHINI, M. T. M.; RIBEIRO, L. F. CONSEQUÊNCIA DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS PSICROTÓFICAS EM LEITE E DERIVADOS. **Revista GeTeC**, 10, n. 25, 2021.

DE CASTRO, R. D. Fatores de patogenicidade, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro fermento, manipuladores e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Brasil. 2019.

DE LONGHI, R.; DE SOUZA CORREIA, S.; BRUZAROSKI, S. R.; POLI-FREDERICO, R. C. *et al.* *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* from refrigerated raw milk: genetic diversity and lipoproteolytic activity. **Journal of Dairy Research**, 89, n. 1, p. 86-89, 2022.

DE PAULA, A.; MEDEIROS, J. D.; FERNANDES, G. D. R.; DA SILVA, V. *et al.* Microbiome of industrialized Minas Frescal Cheese reveals high prevalence of putative bacteria: A concern in the One Health context. **LWT**, 139, p. 110791, 2021.

DE SENA, M. J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes Nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. 2000.

DE SOUZA, I. A.; DA SILVA GIOVANNETTI, A. C.; DE FREITAS SANTOS, L. G.; GANDRA, S. O. D. S. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado na Zona da Mata Mineira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 72, n. 3, p. 152-162, 2017.

DEL OLMO, A.; CALZADA, J.; NUÑEZ, M. The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. **Food Control**, 86, p. 359-366, 2018.

DO NASCIMENTO, E. C.; SABINO, M. C.; DA ROZA CORGUINHA, L.; TARGINO, B. N. *et al.* Lytic bacteriophages UFJF\_PfDIW6 and UFJF\_PfSW6 prevent *Pseudomonas*

fluorescens growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. **Food Microbiology**, 101, p. 103892, 2022.

DOS SANTOS, I. P.; SOUSA, F. M. O.; MELO, T. A. Análise microbiológica e identificação de adulterantes em leite in natura e pasteurizado comercializado em Jequié-BA. **Revista interscientia**, 7, n. 1, p. 66-82, 2019.

EL HADDAD, L.; ROY, J.-P.; KHALIL, G. E.; ST-GELAIS, D. *et al.* Efficacy of two Staphylococcus aureus phage cocktails in cheese production. **International journal of food microbiology**, 217, p. 7-13, 2016.

EL-BAKRY, M.; SANCHEZ, A.; MEHTA, B. M. **Microstructure of dairy products**. John Wiley & Sons, 2018. 1118964225.

ENDERSEN, L.; COFFEY, A. The use of bacteriophages for food safety. **Current Opinion in Food Science**, 36, p. 1-8, 2020.

ESTATÍSTICA-IBGE, I. B. D. G. E. **Censo Agropecuário**. 2017

FARKYE, N. Microbiology of cheese making and maturation. **Encyclopedia of food microbiology**, 1, p. 381-387, 2000.

FEITOSA, S. B.; BORGES, M. P.; DE PAULA, P. A.; BARBOSA, M. S. *et al.* Caracterização microbiológica do queijo Minas frescal comercializado em feiras livres. **Saúde & Ciência em Ação**, 2, n. 2, p. 1-14, 2016.

FERREIRA, A. R. **Diversidade genética de isolados bacterianos de Pseudomonas e gêneros afins relacionados com defeitos de cor em queijo**. 2017. -.

FERREIRA, L. D.; DOS SANTOS, E. D. S. M. CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM QUEIJO MINAS FRESCAL: REVISÃO DE LITERATURA. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, 3, n. 3, p. 123-140, 2022.

FIGUEIREDO, A. C. L.; ALMEIDA, R. C. Antibacterial efficacy of nisin, bacteriophage P100 and sodium lactate against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham. **brazilian journal of microbiology**, 48, p. 724-729, 2017.

FISTER, S.; ROBBEN, C.; WITTE, A. K.; SCHODER, D. *et al.* Influence of environmental factors on phage–bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. **Frontiers in microbiology**, 7, p. 1152, 2016.

FREITAS, M. P. Avaliação microbiológica de queijos artesanais produzidos na cidade de Taió, Santa Catarina. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, 4, n. 2, p. 103-114, 2015.

FURFARO, L. L.; CHANG, B. J.; PAYNE, M. S. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets. **Clinical microbiology reviews**, 31, n. 4, p. 10.1128/cmr.00049-00018, 2018.

FURTADO, M. Principais problemas dos queijos. **São Paulo: Setembro Editora**, 2017.

FURTADO, M.; PARTRIDGE, J. Characterization of nitrogen fractions during ripening of a soft cheese made from ultrafiltration retentates. **Journal of Dairy Science**, 71, n. 11, p. 2877-2884, 1988.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora, 1999.

GARCIA, P.; MARTINEZ, B.; OBESO, J.; RODRIGUEZ, A. Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in applied microbiology**, 47, n. 6, p. 479-485, 2008.

GARCÍA, P.; MADERA, C.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. **International Dairy Journal**, 17, n. 10, p. 1232-1239, 2007.



GARCÍA-ANAYA, M. C.; SEPULVEDA, D. R.; SÁENZ-MENDOZA, A. I.; RIOS-VELASCO, C. *et al.* Phages as biocontrol agents in dairy products. **Trends in Food Science & Technology**, 95, p. 10-20, 2020.

GARVEY, M. Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety. **Antibiotics**, 11, n. 10, p. 1324, 2022.

GOULART, J. Q.; PINTO, A. T. Avaliação do rendimento e características físico-químicas de queijos frescos sem sal produzidos a partir de leite contaminado por bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Brazilian Journal of Development. Curitiba. Vol. 7, n. 5 (May 2021), p. 46892-46900**, 2021.

GOUVÊA, D. M.; MENDONÇA, R. C. S.; LOPEZ, M. E. S.; BATALHA, L. S. Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. **LWT-Food Science and Technology**, 67, p. 159-166, 2016.

GRANDO, C. D. S. G. Uso de bacteriófagos na indústria de alimentos: Estudo de caso. 2021.

GROTH, A. C.; CALOS, M. P. Phage integrases: biology and applications. **Journal of molecular biology**, 335, n. 3, p. 667-678, 2004.

GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M. J. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Applied and environmental microbiology**, 75, n. 1, p. 93-100, 2009.

GUENTHER, S.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. **Bacteriophage**, 1, n. 2, p. 94-100, 2011.

HAGENS, S.; LOESSNER, M. J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied microbiology and biotechnology**, 76, p. 513-519, 2007.

HAVELAAR, A.; HOGEBOM, W. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. **Journal of Applied Microbiology**, 56, n. 3, p. 439-447, 1984.

HIDAKA, T. Isolation of marine bacteriophages from sea-water. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, 37, n. 12, p. 1199-8, 1971.

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**, 55, p. 72-78, 2016.

HUNGARO, H. M.; VIDIGAL, P. M. P.; DO NASCIMENTO, E. C.; GOMES DA COSTA OLIVEIRA, F. *et al.* Genomic characterisation of UFJF\_PfDIW6: a novel lytic *Pseudomonas fluorescens*-phage with potential for biocontrol in the dairy industry. **Viruses**, 14, n. 3, p. 629, 2022.

IBGE. Produção Agropecuária- Leite. 2022.

JALILZADEH, A.; TUNÇTÜRK, Y.; HESARI, J. Extension shelf life of cheese: A review. **International Journal of Dairy Science**, 10, n. 2, p. 44-60, 2015.

JEPSON, C. D.; MARCH, J. B. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. **Vaccine**, 22, n. 19, p. 2413-2419, 2004.

JOINT, F.; ORGANIZATION, W. H.; ADDITIVES, W. E. C. O. F. **Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. World Health Organization, 2017. 9241210028.

JOŃCZYK, E.; KŁAK, M.; MIĘDZYBRODZKI, R.; GÓRSKI, A. The influence of external factors on bacteriophages. **Folia microbiologica**, 56, p. 191-200, 2011.

JOŃCZYK-MATYSIAK, E.; ŁODEJ, N.; KULA, D.; OWCZAREK, B. *et al.* Factors determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 17, n. 8, p. 583-606, 2019.

JURAČ, K.; NABERGOJ, D.; PODGORNIK, A. Bacteriophage production processes. **Applied microbiology and biotechnology**, 103, p. 685-694, 2019.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic escherichia coli. **Nature reviews microbiology**, 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KASMAN, L. M.; KASMAN, A.; WESTWATER, C.; DOLAN, J. *et al.* Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. **Journal of virology**, 76, n. 11, p. 5557-5564, 2002.

KENNY, J. G.; MCGRATH, S.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Bacteriophage Tuc2009 encodes a tail-associated cell wall-degrading activity. **Journal of bacteriology**, 186, n. 11, p. 3480-3491, 2004.

KERBY, G.; GOWDY, R.; DILLON, E.; DILLON, M. *et al.* Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of Escherichia coli. **The Journal of Immunology**, 63, n. 1, p. 93-107, 1949.

KÜMMEL, J.; STESSL, B.; GONANO, M.; WALCHER, G. *et al.* Staphylococcus aureus entrance into the dairy chain: tracking S. aureus from dairy cow to cheese. **Frontiers in microbiology**, 7, p. 1603, 2016.

LAW, B.; ANDREWS, A.; SHARPE, M. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of Pseudomonas fluorescens isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, 44, n. 1, p. 145-148, 1977.

LEIBO, S.; MAZUR, P. Freezing of bacteriophage T4: temperature and rate effects as a function of salt concentration. **Virology**, 38, n. 4, p. 558-566, 1969.

LEITE, J.; STOCK, L.; RUBACK, B. Déficit na balança comercial de lácteos. 2022.

LERICHE, F.; BORDESSOULES, A.; FAYOLLE, K.; KAROUI, R. *et al.* Alteration of raw-milk cheese by Pseudomonas spp.: monitoring the sources of contamination using

fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. **Journal of microbiological methods**, 59, n. 1, p. 33-41, 2004.

LIMA, I. M.; DIIRR, R. M.; RAMOS, M. D. P. P.; DE FÁTIMA ULISSES, A. *et al.*, 2022, **Queijo Minas Frescal: qualidade microbiológica e físico-química**.

LISITA, M. **Evolução da população bacteriana na linha de produção de queijo minas frescal em uma indústria de laticínios, 2005. 61f.** 2005. -, Dissertação (mestrado em ciências)-Escola Superior de Agricultura Luiz de ...

LY-CHATAIN, M. H. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. **Frontiers in microbiology**, 5, p. 51, 2014.

MACHADO, S. G.; BAGLINIÈRE, F.; MARCHAND, S.; VAN COILLIE, E. *et al.* The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in microbiology**, 8, p. 302, 2017.

MACHALELA, A. A. Uso de bacteriófagos como alternativa de conservação de leite em Moçambique. 2016.

MAHONY, J.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; VAN SINDEREN, D. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. **Current opinion in biotechnology**, 22, n. 2, p. 157-163, 2011.

MARINO, M.; SEGAT, A.; MAIFRENI, M.; FRIGO, F. *et al.* Efficacy of ozonation on microbial counts in used brines for cheesemaking. **International Dairy Journal**, 50, p. 9-14, 2015.

MARRELLA, M.; BERTANI, G.; RICCI, A.; VOLPE, R. *et al.* *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* in Fresh Mozzarella Cheese: Effect of Cellobiose Oxidase on Microbiological Stability during Refrigerated Shelf Life. **Foods**, 12, n. 1, p. 145, 2022.

MARTINS, M. D. G. G. Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência. 2018.

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

MATHIEU, J.; YU, P.; ZUO, P.; DA SILVA, M. L. *et al.* Going viral: emerging opportunities for phage-based bacterial control in water treatment and reuse. **Accounts of chemical research**, 52, n. 4, p. 849-857, 2019.

MATTHIJNSSENS, J.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRUSSAARD, C. P. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Sedoreoviridae 2022. **Journal of General Virology**, 103, n. 10, p. 001782, 2022.

MAURA, D.; DEBARBIEUX, L. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. **Applied microbiology and biotechnology**, 90, p. 851-859, 2011.

MEDEIROS, L. J. A. D. M. Condições higiênico-sanitárias do leite comercializado na microrregião sertaneja da Paraíba. 2019.

MERCANTI, D. J.; ROUSSEAU, G. M.; CAPRA, M. L.; QUIBERONI, A. *et al.* Genomic diversity of phages infecting probiotic strains of *Lactobacillus paracasei*. **Applied and environmental microbiology**, 82, n. 1, p. 95-105, 2016.

MIRANDA, N. M. Z. D. Caracterização probiótica de leveduras isoladas de queijo Minas artesanal. 2020.

MIRZAEI, M. K.; MAURICE, C. F. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews Microbiology**, 15, n. 7, p. 397-408, 2017.

NASCIMENTO, E. C. D. Isolamento, caracterização e avaliação da atividade de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* em leite cru. 2020.

NASSER, A. M.; OMAN, S. D. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. **Water Research**, 33, n. 7, p. 1748-1752, 1999.

NEVE, H.; DIETRICH, J.; HELLER, K. A short note on long-term stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages in cheese brine. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, 57, n. 3, p. 191-200, 2005.

NOBREGA, F. L.; VLOT, M.; DE JONGE, P. A.; DREESENS, L. L. *et al.* Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, 16, n. 12, p. 760-773, 2018.

NÁJERA, A. I.; NIETO, S.; BARRON, L. J. R.; ALBISU, M. A review of the preservation of hard and semi-hard cheeses: Quality and safety. **International journal of environmental research and public health**, 18, n. 18, p. 9789, 2021.

O'SULLIVAN, L.; BOLTON, D.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. Bacteriophages in food applications: From foe to friend. **Annual Review of Food Science and Technology**, 10, p. 151-172, 2019.

OECD. **OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029**. OECD Publishing, 2020.

OKURA, M. H.; MOACIR, J. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de queijos minas frescal produzidos com leite cru, leite pasteurizado e de queijo temperado em alguns municípios da região do triângulo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 65, n. 375, p. 33-42, 2010.

OLIVEIRA, F. R. D.; LIRA, G. M.; TORRES, E. A. F. D. S.; SOARES, R. A. M. *et al.* Efeito do beneficiamento sobre o valor nutricional do peixe mandim (*Arius spixii*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44, p. 655-667, 2008.

OLSON, M. R.; AXLER, R. P.; HICKS, R. E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of virological methods**, 122, n. 2, p. 147-152, 2004.

ORLOVA, E. **Bacteriophages and their structural organisation**. InTech, 2012. 9535102729.

PALA, C.; SCARANO, C.; VENUSTI, M.; SARDO, D. *et al.* Shelf life evaluation of ricotta fresca sheep cheese in modified atmosphere packaging. **Italian journal of food safety**, 5, n. 3, 2016.

PALUDETTI, L. F.; KELLY, A. L.; GLEESON, D. Effect of thermoresistant protease of *Pseudomonas fluorescens* on rennet coagulation properties and proteolysis of milk. **Journal of Dairy Science**, 103, n. 5, p. 4043-4055, 2020.

PINTO, G.; ALMEIDA, C.; AZEREDO, J. Bacteriophages to control Shiga toxin-producing *E. coli*—safety and regulatory challenges. **Critical reviews in biotechnology**, 40, n. 8, p. 1081-1097, 2020.

PINTO, N. D. Análise microbiológica em queijos Minas Frescal, comercializados no município de Rolim de Moura, estado de Rondônia. 2019.

PRIGENT, M.; LEROY, M.; CONFALONIERI, F.; DUTERTRE, M. *et al.* A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. **Extremophiles**, 9, p. 289-296, 2005.

PUJATO, S.; QUIBERONI, A.; MERCANTI, D. J. Bacteriophages on dairy foods. **Journal of applied microbiology**, 126, n. 1, p. 14-30, 2019.

PÉREZ VERGARA, M. N.; RAMÍREZ LADINO, K. A. Revisión documental: Aplicación de Bacteriófagos como alternativa para el control de *Listeria monocytogenes* causante de cuadros de mastitis subclínica en Bovinos de Colombia. 2019.

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

QUINTIERI, L.; CAPUTO, L.; DE ANGELIS, M.; FANELLI, F. Genomic analysis of three cheese-borne *Pseudomonas lactis* with biofilm and spoilage-associated behavior. **Microorganisms**, 8, n. 8, p. 1208, 2020.

RABELO, C. A.; RICARDO, M.; PORFIRIO, J. A.; PIMENTEL, T. C. *et al.* Psychrotrophic bacteria in Brazilian organic dairy products: identification, production of deteriorating enzymes and biofilm formation. **Food Science and Technology**, 41, p. 799-806, 2021.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Food Science and Technology**, 29, p. 19-23, 2009.

RIBEIRO, L. F.; FREIRE, A. M.; SILVEIRA, M. D. C. T.; CARVALHO, A. L. S. OCORRÊNCIA DE PIGMENTAÇÃO AZUL EM QUEIJO MINAS FRESCAL CAUSADA POR PSEUDOMONAS: PIGMENTAÇÃO AZUL EM QUEIJO MINAS FRESCAL. **Revista GeTeC**, 12, n. 37, 2023.

ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; DA SILVA, R.; DE SOUZA, E. B. *et al.* Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. **Frontiers in Microbiology**, 12, p. 3756, 2021.

ROSSI, C.; SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; ANNIBALLI, F. *et al.* Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. **Food Control**, 86, p. 241-248, 2018.

ROVEDILHO, J. A. S. P. Avaliação de processos de limpeza de tanques de armazenamento de leite em unidade de ordenha mecanizada. 2023.

RUSSELL, D. W.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SAFWAT MOHAMED, D.; FAROUK AHMED, E.; MOHAMED MAHMOUD, A.; ABD EL-BAKY, R. M. *et al.* Isolation and evaluation of cocktail phages for the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* serotype O104: H4 and *E. coli* O157: H7 isolates causing diarrhea. **FEMS microbiology letters**, 365, n. 2, p. fnx275, 2018.



SAMARŽIJA, D.; ZAMBERLIN, Š.; POGAČIĆ, T. Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. **Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka**, 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas frescal disponível no mercado**. 2007. -, Universidade de São Paulo.

SANTOS, M. R. A. An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. **Nucleic acids research**, 19, n. 19, p. 5442, 1991.

SARAIVA, B. B.; RODRIGUES, B. M.; DA SILVA JUNIOR, R. C.; DA SILVA SCAPIM, M. R. *et al.* Photodynamic inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in Minas Frescal cheese using curcumin as a photosensitizer. **Lwt**, 151, p. 112143, 2021.

SCARASCIA, G.; YAP, S. A.; KAKSONEN, A. H.; HONG, P.-Y. Bacteriophage infectivity against *Pseudomonas aeruginosa* in saline conditions. **Frontiers in microbiology**, 9, p. 875, 2018.

SEAMAN, P. F.; OCHS, D.; DAY, M. J. Small-colony variants: a novel mechanism for triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 59, n. 1, p. 43-50, 2007.

SHARMA, S.; DATTA, S.; CHATTERJEE, S.; DUTTA, M. *et al.* Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 19393, 2021.

SHARP, D.; HOOK, A.; TAYLOR, A.; BEARD, D. *et al.* Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, 165, n. 1, p. 259-270, 1946.

SILLANKORVA, S. M.; OLIVEIRA, H.; AZEREDO, J. Bacteriophages and their role in food safety. **International journal of microbiology**, 2012, 2012.

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

SILVA, F. T. **Queijo minas frescal**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa ..., 2005. 857383305X.

SILVA, J. R.; COELHO, K. O.; ROCHA, F. T.; NEVES, R. B. *et al.* Qualidade microbiológica de salmouras utilizadas na salga de queijos muçarela. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, 13, n. 1, p. 48-52, 2017.

SINGH, P.; WANI, A. A.; KARIM, A.; LANGOWSKI, H. C. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: A review. **International Journal of Dairy Technology**, 65, n. 2, p. 161-177, 2012.

SMREKAR, F.; CIRINGER, M.; PETERKA, M.; PODGORNIK, A. *et al.* Purification and concentration of bacteriophage T4 using monolithic chromatographic supports. **Journal of Chromatography B**, 861, n. 2, p. 177-180, 2008.

SPANU, C.; PIRAS, F.; MOCCI, A.; NIEDDU, G. *et al.* Use of *Carnobacterium* spp protective culture in MAP packed Ricotta fresca cheese to control *Pseudomonas* spp. **Food microbiology**, 74, p. 50-56, 2018.

STELLATO, G.; DE FILIPPIS, F.; LA STORIA, A.; ERCOLINI, D. Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. **Applied and environmental microbiology**, 81, n. 22, p. 7893-7904, 2015.

STELLATO, G.; UTTER, D. R.; VOORHIS, A.; DE ANGELIS, M. *et al.* A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. **Frontiers in microbiology**, 8, p. 264, 2017.

SÁNCHEZ ZAPATA, E. P.; VILLAR DONAIRE, J. D. Aislamiento e identificación de bacteriófagos como potenciales agentes de biocontrol de *Escherichia Coli* Y *Salmonella* spp para su uso en la industria alimentaria. 2022.

TABLA, R.; GÓMEZ, A.; REBOLLO, J. E.; MOLINA, F. *et al.* Effectiveness of a bacteriophage cocktail in reducing cheese early blowing caused by *Escherichia coli*. **LWT**, 153, p. 112430, 2022.

TANAKA, C.; YAMADA, K.; TAKEUCHI, H.; INOKUCHI, Y. *et al.* A lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk. **Applied and Environmental Microbiology**, 84, n. 18, p. e00111-00118, 2018.

TEIDER, P. I.; RIBEIRO, J. C.; OSSUGUI, E. H.; TAMANINI, R. *et al.* *Pseudomonas* spp. and other psychrotrophic microorganisms in inspected and non-inspected Brazilian Minas Frescal cheese: Proteolytic, lipolytic and AprX production potential. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 39, p. 807-815, 2019.

TEY, B. T.; OOI, S. T.; YONG, K. C.; NG, M. Y. T. *et al.* Production of fusion m13 phage bearing the di-sulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. **African Journal of Biotechnology**, 8, n. 2, p. 268, 2009.

TOMAT, D.; BALAGUÉ, C.; AQUILI, V.; VERDINI, R. *et al.* Resistance of phages lytic to pathogenic *Escherichia coli* to sanitisers used by the food industry and in home settings. **International Journal of Food Science & Technology**, 53, n. 2, p. 533-540, 2018.

TURNER, D.; KROPINSKI, A. M.; ADRIAENSSENS, E. M. A roadmap for genome-based phage taxonomy. **Viruses**, 13, n. 3, p. 506, 2021.

TURNER, D.; SHKOPOROV, A. N.; LOOD, C.; MILLARD, A. D. *et al.* Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. **Archives of Virology**, 168, n. 2, p. 74, 2023.

VAN TASSELL, J.; MARTIN, N.; MURPHY, S.; WIEDMANN, M. *et al.* Evaluation of various selective media for the detection of *Pseudomonas* species in pasteurized milk. **Journal of dairy science**, 95, n. 3, p. 1568-1574, 2012.

VAZ, C.; RECH, D.; COLDEBELLA, A. Bacteriófagos: estudo da ação lítica sobre *Salmonella* Minnesota isoladas de cama de frango. 2022.

VIDIGAL, P. M. P.; HUNGARO, H. M. Genome sequencing of *Pseudomonas fluorescens* phage UFJF\_PfSW6: a novel lytic Pijolavirus specie with potential for biocontrol in the dairy industry. **3 Biotech**, 13, n. 2, p. 67, 2023.

VINHA, M. B.; DE OLIVEIRA PINTO, C. L.; CHAVES, J. B. P. Estafilococos coagulase positiva em queijos Minas Frescal produzidos em agroindústrias familiares. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 73, n. 2, p. 62-72, 2018.

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. D. O.; SOUZA, M. R. D. M.; CHAVES, J. B. P. Fatores socioeconômicos da produção de queijo minas frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, 40, p. 2023-2029, 2010.

WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, 5, n. 1, p. 226-235, 2014.

WOLFSCHOON POMBO, A. Variações no teor de ácido úrico do leite de vaca. **Ciênc. cult.(São Paulo)**, p. 214-217, 1983.

WONGYOO, R.; SUNTHORNTHUMMAS, S.; SAWAENGWONG, T.; SURACHAT, K. *et al.* Isolation of bacteriophages specific to *Pseudomonas mosselii* for controlling milk spoilage. **International Dairy Journal**, 145, p. 105674, 2023.

YOUSSEF, O.; AGÚN, S.; FERNÁNDEZ, L.; KHALIL, S. A. *et al.* Impact of the calcium concentration on the efficacy of phage phiPLA-RODI, LysRODIΔAmi and nisin for the elimination of *Staphylococcus aureus* during lab-scale cheese production. **International Journal of Food Microbiology**, 399, p. 110227, 2023.

ZABURLIN, D.; QUIBERONI, A.; MERCANTI, D. Changes in environmental conditions modify infection kinetics of dairy phages. **Food and environmental virology**, 9, p. 270-276, 2017.

ZACHARY, A. Physiology and ecology of bacteriophages of the marine bacterium *Beneckeia natriegens*: salinity. **Applied and environmental microbiology**, 31, n. 3, p. 415-422, 1976.

ÁVILA, M.; SÁNCHEZ, C.; CALZADA, J.; MAYER, M. J. *et al.* Isolation and characterization of new bacteriophages active against *Clostridium tyrobutyricum* and their role in preventing the late blowing defect of cheese. **Food Research International**, 163, p. 112222, 2023.