

**JÉSSICA FERNANDES CARVALHAIS**

**EFICIÊNCIA DO BACTERÍOFAGO LISIGC NO CONTROLE DE  
LISTERIA MONOCYTOGENES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C331e  
2015  
Carvalhais, Jéssica Fernandes, 1991-  
Eficiência do bacteriófago LisIGC no controle de  
*Listeria monocytogenes* / Jéssica Fernandes Carvalhais. -  
Viçosa, MG, 2015.  
xiv, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Edimar Aparecida Filomeno Fontes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Listeria monocytogenes* - Controle biológico.  
2. Bacteriófago. 3. Leite. 4. Queijo. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.  
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 632.32

**JÉSSICA FERNANDES CARVALHAIS**

**EFICIÊNCIA DO BACTERÍOFAGO LISIGC NO CONTROLE DE  
LISTERIA MONOCYTOGENES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae.

---

**Regina Célia Santos Mendonça**  
**(Co-orientadora)**

---

**Maria Cristina Dantas Vanette**  
**(Co-orientadora)**

---

**Luciana Rodrigues Cunha**

---

**Edimar Aparecida Filomeno Fontes**  
**(Orientadora)**

À Deus, que de forma espetacular guiou meus passos,  
cuidou dos meus sonhos e me deu forças  
para alcançar a vitória.

**DEDICO**

*“Entrega Teu caminho ao Senhor,  
Confia Nele e o mais Ele fará”*  
Salmista Davi

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela forma grandiosa com que cuidou e guiou meus passos e sempre esteve ao meu lado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À professora Edimar Ap. Filomeno Fontes pela orientação, confiança, dedicação e apoio incondicional durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Regina Célia Santos Mendonça, pela grandiosa colaboração neste trabalho e por dividir seus conhecimentos contribuindo para o enriquecimento da pesquisa.

À professora Maria Cristina Dantas Vanette, pela co-orientação e sugestões no desenvolvimento do trabalho.

À professora Luciana pela disponibilidade e participação na banca examinadora.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) pela amizade e colaboração no desenvolvimento da pesquisa, em especial ao Nélio, Carol, Laís, Dani e Marjori pela colaboração e por sempre estarem prontos a ajudar.

As saudosas amigas Mariana Gomes e Brígida Costa in memoriam, pela oportunidade de entender que para os bons há um tempo determinado por Deus nessa terra.

Aos meus pais, Seila e Genaro pelo apoio e confiança e toda minha família e de forma especial aos meus tios e avós por sempre me motivarem durante essa caminhada.

Ao Leonardo e toda sua família pelo companheirismo e amizade, vocês fizeram parte desta conquista e se tornaram parte da minha família.

À todos meu amigos que estiveram do meu lado dando forças e motivação e em especial as minhas grandes amigas Thais Jordânia e Mônica Costa pelo companheirismo e por vibrar comigo a cada vitória conquistada.

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

**Meus sinceros agradecimentos.**

## **BIOGRAFIA**

Jéssica Fernandes Carvalhais, filha de Genaro Carvalhais e Seila Fernandes da Costa, nasceu em Ubá - Minas Gerais, em 23 de Janeiro de 1991.

Em fevereiro de 2013 graduou-se em Tecnologia em Laticínios pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba.

Em março de 2013 ingressou no curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais submetendo-se à defesa de dissertação no dia 25 de fevereiro de 2015.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Produção de Queijo Minas Frescal e suas Peculiaridades</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Listeria</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Histórico</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Características</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Epidemiologia e Patogenicidade</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Características Clínicas</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3</b>	<b>SEGURANÇA ALIMENTAR</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4</b>	<b>BACTERÍOFAGOS E SUA UTILIZAÇÃO NO BIOCONTROLE</b> ....	<b>12</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Bacteriófagos</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Ciclo de infecção de bacteriófagos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Aplicação de bacteriófagos no biocontrole de patógenos</b> .....	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Micro-organismos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolamento e purificação do bacteriófago</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Isolamento de bacteriófagos</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Avaliação do isolamento dos bacteriófagos</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Purificação dos bacteriófagos</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Propagação dos bacteriófagos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Titulação dos bacteriófagos</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em meio de cultura</b> .....	<b>222</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em leite simulando a condição de fabricação de queijo Minas Frescal</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em queijo Minas Frescal em duas temperaturas de armazenamento</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4</b>	<b>Esquema de distribuição dos tratamentos para avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em caldo meio de cultura</b> ....	<b>25</b>
<b>3.5</b>	<b>Esquema de distribuição dos tratamentos para avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em leite</b> .....	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Elaboração do Queijo Minas Frescal com diferentes concentrações de Bacteriófagos</b> .....	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Avaliação da atividade do bacteriófago pela variação da densidade óptica</b> ..	<b>30</b>
<b>3.8</b>	<b>Análises Microbiológicas</b> .....	<b>30</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Contagem de <i>L. monocytogenes</i></b> .....	<b>30</b>

3.8.1.1	Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> crescida em Caldo Triplicaseína (TSB).....	30
3.8.1.2	Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> em leite, soro e exsudado.....	30
3.8.1.3	Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> em queijo Minas Frescal.....	31
3.8.2	Contagem de bacteriófagos.....	32
3.8.2.1	Contagem de bacteriófagos em Caldo Tryptic Soy Broth - TSB.....	32
3.8.2.2	Contagem de bacteriófagos em leite, soro e exsudado.....	32
3.8.2.3	Contagem de bacteriófagos em queijo Minas Frescal.....	33
3.8.3	Caracterização Física e química do queijo Minas Frescal Fabricado...34	
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1	Isolamento, purificação, propagação e titulação do bacteriófago de <i>L. monocytogenes</i> .....	35
5.2	Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em meio de cultura.....	38
5.3	Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em leite simulando a condição de fabricação de queijo Minas Frescal.....	43
5.4	Efeito do tratamento com bacteriófago na sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> em queijo Minas Frescal durante estocagem sob refrigeração.....	49
5.4.1	Análises microbiológicas do leite inoculado de <i>L. monocytogenes</i> e bacteriófagos, do soro de leite e do exsudado proveniente da fabricação de queijo Minas Frescal.....	49
5.4.	Caracterização física e química do Queijo Minas Frescal Produzido .....	51
5.4.3	Contagem de <i>L. monocytogenes</i> e bacteriófagos em queijo Minas Frescal em diferentes temperaturas durante 21 dias de armazenamento.....	51
5.4.4	Contagem de Bacteriófagos em queijo Minas Frescal por duas técnicas diferentes.....	57
6.	CONCLUSÃO.....	58
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de Queijo Minas Frescal por diferentes autores.....	4
<b>Tabela 2.</b> Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> em Queijo Minas Frescal em diferentes regiões do país.....	5
<b>Tabela 3.</b> Avaliação da presença de bacteriófagos em diversas fontes e suas respectivas origens.....	36
<b>Tabela 4.</b> Valores médios (desvio padrão) densidade óptica a 600 nm e da contagem em placas de <i>L. monocytogenes</i> em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) durante 24 horas de incubação a 37 °C.....	40
<b>Tabela 5.</b> Contagem média (desvio-padrão) de <i>L. monocytogenes</i> (Log de UFC·mL <sup>-1</sup> ) e título do fago (UFP· mL <sup>-1</sup> ) adicionados nos leites utilizados na fabricação dos queijos e para o soros de leites obtidos da fabricação dos queijos e exsudado após 1 dia de armazenamento para os diferentes tratamentos do experimento.....	50
<b>Tabela 6.</b> Composição médica do queijo Minas Frescal fabricado e de diferentes autores.....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclos de Infecção de bacteriófagos temperados.....	15
<b>Figura 2-</b> Fluxograma das etapas de fabricação do queijo Minas Frescal em escala laboratorial.....	29
<b>Figura 3:</b> Exemplos de Placas de lise formadas pelo bacteriófago de <i>L. monocytogenes</i> isolado de intestino de galinha caipira.....	37
<b>Figura 4.</b> Estudo da eficiência de bacteriófago no controle de população de <i>L. monocytogenes</i> em meio de cultura durante 24 horas de incubação a 37 °C.....	41
<b>Figura 5.</b> Estudo da eficiência de bacteriófago no controle de população de <i>L. monocytogenes</i> em leite adicionado de sal, ácido láctico e cloreto de cálcio durante 24 horas de incubação a 37 °C.....	47
<b>Figura 6:</b> Variação da contagem de listeria e fago durante 21 dias de armazenamento de queijos Minas Frescal.....	54

## RESUMO

CARVALHAIS, Jéssica Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Eficiência do bacteriófago LisIGC no controle de *Listeria monocytogenes*.** Orientadora: Edimar Aparecida Filomeno Fontes. Coorientadores: Regina Célia Santos Mendonça e Maria Cristina Dantas Vanetti.

Bacteriófagos são vírus específicos de bactérias, os considerados líticos infectam e promovem a lise celular e consequente morte da bactéria hospedeira. Diante disso o interesse da utilização de fagos no controle específico de bactérias patogênicas durante as fases de pré e pós-processamento e armazenamento de alimentos é crescente e muito pesquisado atualmente. O objetivo deste trabalho foi isolar bacteriófagos com especificidade em culturas de *L. monocytogenes* e avaliar a eficiência de diferentes concentrações dos mesmos no controle de populações *L. monocytogenes* em meio de cultura, em leite e em queijos. O bacteriófago foi isolado de intestinos de galinhas caipiras oriundas da Zona Rural de Viçosa-MG. Foram testadas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup> do bacteriófago no controle de *L. monocytogenes* em concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Os testes realizados em meio de cultura e leite demonstraram a eficiência do bacteriófago reduzindo aproximadamente 4 ciclos logarítmicos da população de *L. monocytogenes* no período de 9 a 12 horas. Em ambos os testes o tratamento mais eficiente foi quando utilizado a concentração  $10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup> de bacteriófagos. No teste em queijo observou-se redução de 3,26 e 1,07 ciclos logarítmico na população de *L. monocytogenes* após 14 dias de armazenamento nas temperaturas de 15 °C e 5 °C respectivamente. Foram comparadas duas técnicas para enumeração de bacteriófagos, contagem em placas e contagem por microgotas, não sendo observada diferença entre as duas técnicas.

Os resultados desta pesquisa demonstram que o uso de bacteriófagos líticos de no controle de populações *L. monocytogenes* foi eficiente nas três matizes estudadas, evidenciando o potencial da aplicação de fagos no biocontrole de populações microbianas.

## ABSTRACT

CARVALHAIS, Jéssica Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Efficiency of bacteriophage Lis I Gc in control of *Listeria monocytogenes***. Adviser: Edimar Aparecida Filomeno Fontes. Co-Adviser: Regina Célia Santos Mendonça e Maria Cristina Dantas Vanetti.

Bacteriophages are viruses specific bacteria, the lytic considered infect and promote cell lysis and subsequent death of the host bacterium. Therefore the interest of the use of phages as agents for particular control of pathogenic bacteria during the phases of pre and post processing and storage of food is increasing and currently researched. The objective of this study was to isolate bacteriophages with specificity for *L. monocytogenes* cultures and evaluate the efficiency of different concentrations of the same in the control of *L. monocytogenes* populations in culture medium, milk and cheese. The bacteriophage was isolated from the intestines of hens arising from the Rural Area of Viçosa-MG. Concentrations tested were  $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^8$  PFU.ml<sup>-1</sup> bacteriophage in control of *L. monocytogenes*. The tests performed in culture medium and milk demonstrated bacteriophage efficiency by reducing approximately 4 log cycles of *L. monocytogenes* in the period from 9 to 12 hours. In both tests was the most effective treatment when used at a concentration of  $10^8$  PFU. ml<sup>-1</sup> bacteriophages. In the test cheese was observed decrease of 3.26 and 1.07 logarithmic cycles in *L. monocytogenes* population after 14 days of storage at temperatures of 15 ° C and 5 ° C respectively. We compared two techniques for enumeration of bacteriophages, the count plating technique and score by droplets, with no observed difference between the two techniques.

These results demonstrate that the use of lytic bacteriophages of *L. monocytogenes* in the control population was efficient in three ways studies showed the potential application of the phage biocontrol microbial populations.

# 1. INTRODUÇÃO

A indústria do leite tem papel relevante na economia do país, com destaque no estado de Minas Gerais, grande fornecedor desta matéria prima. Entre os derivados do leite, o queijo é tradicionalmente um dos principais produtos fabricados no estado e comercializado em todo país.

O queijo Minas Frescal, é considerado queijo fresco de curta vida de prateleira devido ao seu alto teor de umidade, possui pH próximo a neutralidade e grande manipulação devido ao processo de fabricação. Essas características favorecem ambiente favorável à contaminação, sobrevivência e multiplicação de bactérias deterioradoras e patogênicas.

Com objetivo de atender as exigências da legislação e garantir o controle de qualidade em todas as etapas da cadeia produtiva do leite, pesquisadores e beneficiadores de leite têm buscando alternativas às tecnologias tradicionais como forma de garantir a qualidade do leite e derivados nos diferentes pontos da cadeia produtiva.

A contaminação de produtos de origem animal por micro-organismos deterioradores e patogênicos preocupante, pois pode acarretar inúmeras perdas econômicas, doenças e desencadear surtos de origem alimentar.

Dentre os micro-organismos que podem contaminar leite e seus derivados, em especial os queijos, *L. monocytogenes* tem destaque devido a vários casos já registrados de surtos causados pelo consumo de alimentos contaminados por este patógeno.

A importância deste micro-organismo se deve principalmente, a capacidade de crescer, mesmo que lentamente sob temperaturas de refrigeração. Considerando que a maioria dos produtos lácteos são comercializados refrigerados, esta característica se torna um problema em potencial. Outra característica importante é sua capacidade de crescer e suportar condições adversas como, por exemplo, pH baixo e concentrações de sal superiores a 20 %. Além disso, é capaz de colonizar superfícies formando de biofilmes em

equipamentos da indústria de alimentos podendo permanecer ali por longos períodos.

O controle do crescimento de bactérias patogênicas por meio do uso de bacteriófagos tem sido alvo de pesquisas, sendo proposto como uma alternativa de controle de populações microbianas. Bacteriófagos são vírus cujos hospedeiros obrigatórios são às bactérias. Também conhecidos como “fagos”, encontram-se em todos os lugares nos quais estejam presentes bactérias, e dividem um ambiente comum com o respectivo hospedeiro. São capazes de infectar espécies específicas ou até mesmo grupos dentro de uma mesma espécie.

A utilização de bacteriófagos no biocontrole de população de micro-organismos em alimentos, como antimicrobiano e como ferramenta para detecção de patógenos tem aumentado significativamente nos últimos anos. Diante disso, a pesquisa e o desenvolvimento de técnicas de controle de *L. monocytogenes* em queijos são de grande relevância podendo contribuir de forma significativa para o controle de qualidade na indústria de alimentos. Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi isolar bacteriófagos e avaliar a eficácia da sua utilização no biocontrole de populações de *L. monocytogenes* em diferentes matrizes ao longo de diferentes períodos de incubação.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Produção de Queijo Minas Frescal e suas Peculiaridades**

O Brasil tem posição importante no cenário mundial de produção de leite ocupando em 2014 a terceira posição em produção, atrás apenas da Índia e da União Europeia. Regionalmente no 1º trimestre de 2014 o Sudeste foi responsável por 41,4% da aquisição nacional de leite, o Sul por 33,8% e o Centro-oeste por 14,7%. O Norte e Nordeste participaram com percentual igual a 5,0% respectivamente (IBGE, 2014). Segundo dados do ministério pecuária e agricultura em 2014, o país teve o segundo melhor desempenho da

história no valor das exportações de lácteos, com US\$ 345,4 milhões, o que correspondeu a volume de 86 mil toneladas. Sendo que Minas Gerais é o estado que mais adquire leite cerca de 28 % do total nacional (IBGE, 2014).

A produção de queijos representa uma das mais importantes atividades para os estabelecimentos industriais, pois 34 % de todo o leite recebido é direcionado à fabricação de queijos (BRASIL, 2011). O estado de Minas Gerais possui a maior bacia leiteira do país, com um volume de produção equivalente a 26 % da produção nacional. Minas Gerais é também o Estado que mais produz queijos (ABIQ, 2013).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Portaria nº 352 de 04/09/1997, entende-se por queijo Minas Frescal, 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.

O queijo é um alimento nutritivo, constituído por proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo, água, ácido láctico, cloreto de sódio e vitaminas, entre elas A e B (PERRY, 2004).

O queijo Minas Frescal é um dos queijos populares do país, sendo consumido por todas as camadas socioeconômicas, durante todo o ano, fazendo parte de diferentes pratos. Apresenta ampla aceitação no mercado, excelente rendimento na fabricação e facilidade de produção (Martins et al., 2012). Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Queijo (ABIQ) este queijo é o terceiro mais consumido no Brasil representando mais de 5 % do total da produção de queijos.

A fabricação do queijo Minas Frescal tem uma tecnologia das mais simples e, por isso, muito difundida. Com a evolução das técnicas industriais e do conhecimento científico, a tecnologia de fabricação passou modificações visando à melhoria da qualidade do produto, aumento do rendimento de fabricação ou ainda maior padronização do produto final (Martins et al., 2012).

A produção de queijo Minas Frescal constitui um componente econômico fundamental para a sustentabilidade de pequenos produtores. Entretanto, há necessidade de adequações na infraestrutura das agroindústrias, condição essencial para a obtenção de queijos de acordo com os padrões de qualidades (Vinha et al., 2010).

A composição do queijo Minas Frescal pode ser considerada variada, dependendo do modo e região de fabricação. Martins et al., (2012), Silva et al., (2008) e Andreatta, (2006) descrevem a composição deste queijo conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição de Queijo Minas Frescal segundo diferentes autores.

	<b>Martins et al. (2012)</b>	<b>Silva et al.(2008)</b>	<b>Andreatta (2006)</b>
<b>Gordura (%)</b>	23,5	28,98	58,9
<b>Proteína (%)</b>	19,5	23,8	16,94
<b>Cinzas (%)</b>	2,4	1,83	4,23
<b>Umidade (%)</b>	56,3	61,67	63,05
<b>Sólidos Totais (%)</b>	43,6	38,33	36,95
<b>pH</b>	6,65	6,42	6,8

O queijo Minas Frescal tem como característica peculiar um alto teor de umidade, o que o torna, portanto, um produto perecível e susceptível aos fenômenos bioquímicos e ação de micro-organismos que afetam as suas características de qualidade, rendimento e durabilidade apresentando uma vida de prateleira curta, mesmo sob condições adequadas de refrigeração.

Alguns estudos relatam a contaminação de queijos Minas Frescal por *L. monocytogenes*, isso porque os queijos são, em geral, produtos muito manipulados e, assim, passíveis de contaminação, o que causa preocupação tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças no consumidor (Pinto et al., 2009). A Tabela 2

apresenta resultados de estudos de pesquisa de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal em diferentes regiões do país.

**Tabela 2.** Pesquisa de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal em diferentes regiões do país.

<b>Local</b>	<b>N.º de amostras</b>	<b>Contaminadas</b>	<b>Referência</b>
Juiz de Fora MG	55	11	Brito et al., 2008
Uberlândia MG	148	4,8	Pereira et al., 2006
Jaboticabal SP	40	15	Schocken et al., 2006
Araguaína TO	50	8	Vieira et al., 2001
Rio de Janeiro RJ	25	16	Sá et al., 2004

## **2.2 Listeria**

### **2.2.1 Histórico**

Os primeiros relatos de *L. monocytogenes* e listeriose registam-se do século XIX. Em 1889, Pfeiffer relatou uma doença em seres humanos de causa desconhecida, possivelmente a listeriose. Porém, somente em 1919, na Suécia, é que o agente da doença foi isolado a partir de fígado de coelho, por Hillers (SILVA, 2011).

A primeira descrição do micro-organismo foi feita por Murray et al., em 1926. Eles descreveram uma infecção espontânea que ocorreu entre os coelhos e cobaias de laboratório no biotério da Universidade de Cambridge, no Reino Unido, e denominaram o agente de *Bacterium monocytogenes*, em virtude de a infecção ser caracterizada por uma monocitose.

Os primeiros isolamentos confirmados do micro-organismo em indivíduos infectados datam de 1929. Com o passar do tempo, casos esporádicos e

pontuais de listeriose foram identificados, os quais estavam associados a indivíduos que tiveram contato com animais doentes, caracterizando-a como uma doença ocupacional.

Na década de 1980, devido ao relato de diversos surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados, o interesse pela bactéria aumentou rapidamente entre as indústrias, agências reguladoras e pesquisadores (SILVA, 2011).

O gênero *Listeria* está relacionado filogeneticamente aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Brochotrix*. As espécies citadas podem ser divididas em dois grupos: hemolíticas e não hemolíticas e *L.monocytogenes* pertence ao primeiro grupo (BILLE, 2003).

De acordo com Jay (2005), a *L. monocytogenes* está representada por treze sorovares, alguns dos quais são compartilhados por *L. innocua* e por *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes ela é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*. A grande heterogeneidade antigênica desta última espécie pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de se multiplicar.

### **2.2.2 Características**

As espécies do gênero *Listeria* são pequenos bastonetes gram positivos, não formam esporos, não formam cápsula, anaeróbios facultativos, móveis devido a flagelos peritríquios e em meio-sólido, a 20 °C a 25 °C apresentam motilidade típica em forma de guarda-chuva. Crescem numa faixa de temperatura entre -0,4 °C a 50 °C, com crescimento ótimo de 30 °C a 37 °C (BILLE et al., 2003). A faixa de pH para crescimento está entre 5,6 a 9,6, mas o crescimento de *L. monocytogenes*, em cultura, foi constatado em pH abaixo de 4,0. A atividade de água ótima é acima de 0,97, porém, a mínima varia

entre 0,90 a 0,93 e toleram altas concentrações de cloreto de sódio (10 % a 12 %) (JAY, 2005).

As bactérias do gênero *Listeria* apresentam reação positiva para catalase e negativa para oxidase; apresentam teste positivo para vermelho de metila; produzem amônia a partir de arginina; além disso, podem crescer na presença de 10 % ou até 40 % de bile e possuem a capacidade de hidrolisar esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; reagem negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase; hidrolisam amido e uréia; reduzem telurito (JAY, 2005).

*L. monocytogenes* é um patógeno intracelular com capacidade de penetrar e multiplicar-se dentro do citoplasma da célula do hospedeiro (macrófagos, fibroblasto, eritrócitos) e invadir células adjacentes, além de se proteger do sistema imunológico do hospedeiro (MONTEIRO, 2013).

Este micro-organismo requer nutrientes específicos para seu crescimento, como os aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina e valina além das vitaminas biotina, riboflavina e tiamina (JAY, 2005).

Uma das principais características das bactérias do gênero *Listeria* é a capacidade de se multiplicar em ampla faixa de temperatura (2,5 °C a 45 °C), em meios com poucos nutrientes e ser resistente a sucessivos congelamentos e descongelamentos. Outro importante aspecto é a capacidade de formação de biofilme e de biotransferência, tanto em alimentos como em outras superfícies não nutritivas e que confere proteção ao micro-organismo (OLIVEIRA et al., 2010).

*L. monocytogenes* está presente nos solos, silagem, efluentes de esgoto, cursos d'água e mais de 50 espécies animais, incluindo ruminantes, suínos, equinos, cães, gatos, e várias espécies de aves. Em algumas áreas, mais de 70 % dos infectados são portadores assintomáticos (JAY, 2005).

### **2.2.3 Epidemiologia e Patogenicidade**

*L. monocytogenes* pode infectar humanos e outros animais pelas seguintes vias: oral, ocular, cutânea, respiratória ou urogenital. O trato intestinal é local de entrada para *L. monocytogenes* no organismo através das células epiteliais no ápice das microvilosidades. O micro-organismo se difunde, não só pelo interior da célula, como também de uma célula para outra. Na fase seguinte, são ingeridas por macrófagos, mas não induzem uma resposta inflamatória significativa. As células de *L. monocytogenes*, uma vez dentro dos macrófagos, encontram-se protegidas dos leucócitos polimorfos nucleares (JACQUET et al., 2004).

O aspecto chave para patogenicidade de *L. monocytogenes* é sua capacidade de invadir e multiplicar-se em fagócitos e não fagócitos. A adesão da *L. monocytogenes* presume-se que seja mediado por moléculas na superfície da célula com receptores complementares presente na célula eucariótica (GREER, 2005).

A hemólise é considerada importante fator na virulência das cepas e alguns sorotipos específicos, como o 1/2a e o 4b, são os mais comumente relacionados à surtos. Os genes de virulência de *Listeria* mais importantes (p. ex. *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* e *hpt*) são regulados pelo ativador transcripcional PrfA. Os fatores de virulência PrfA regulados, tais como a LLO, PlcA e PlcB, são produzidos em altos níveis quando a temperatura aumenta para 37 °C, ou seja, a temperatura do hospedeiro (MILOHANIC et al., 2004).

### **2.2.4 Características Clínicas**

Listeriose é a denominação de um grupo geral de desordens causadas pela *L. monocytogenes* que incluem febre e dores musculares, às vezes precedidas de diarreia e outros sintomas gastrointestinais. As manifestações

clínicas com casos agudo, subagudo e crônico, apresentam extraordinário polimorfismo. Tal fato resulta da localização da *L. monocytogenes* em vários sítios anatômicos do hospedeiro, mas, sendo a meningite e a septicemia, as formas comumente relatadas em todos os grupos etários (AMORIM, 2013).

Os sintomas variam de acordo com a pessoa infectada. Gestantes apresentam febre e outros sintomas inespecíficos como fadiga e dores, além de poder levar a morte fetal, parto prematuro, ou risco de infecção do recém-nascido. Em outras pessoas, não gestantes, os sintomas, além de febre e dores musculares, podem incluir dor de cabeça, rigidez do pescoço, confusão, perda de equilíbrio e convulsões (BRASIL, 2011). Em idosos e pessoas com condições de imunossupressão, septicemia e meningite são as apresentações clínicas mais comuns. A taxa de letalidade em recém-nascidos é de 30 %; em adultos (sem gravidez) é de 35 %; em torno de 11 % para menores 40 anos e 63 % para maiores 60 anos. Quando ocorre septicemia, a taxa de letalidade é de 50 % e com meningite pode chegar a 70 %. A gastroenterite causada por *L. monocytogenes* tem um período de incubação relativamente curto, que vai de poucas horas a dois ou três dias. No entanto, a forma grave da doença invasiva pode ter um período de incubação extremamente longo, variando de 3 dias a 3 meses.

A dose mínima de infecção não foi ainda estabelecida, mas informações sobre a população de *L. monocytogenes*, em alimentos contaminados envolvidos em surtos, indicam que, em geral, populações entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC·g<sup>-1</sup> (Unidades Formadoras de Colônia por grama de alimento) foram responsáveis pela doença (SILVA, 2011).

### **2.3 SEGURANÇA ALIMENTAR**

A segurança alimentar abrange o aspecto quantitativo, abordando a disponibilidade de alimentos, e o qualitativo, focando, principalmente, a saúde

do consumidor. Este princípio envolve todos os elos da cadeia produtiva de alimentos (PINTO et al., 2009).

O avanço da tecnologia propiciou o desenvolvimento de diferentes técnicas para garantir a qualidade e inocuidade dos produtos alimentícios. Entretanto, as doenças causadas por patógenos veiculadas por alimentos continuam sendo um problema para a saúde pública o que aponta a necessidade de métodos mais eficazes para o combate de micro-organismos patogênicos (SILVA, 2011).

Os micro-organismos estão presentes no ambiente, nos animais e nos vegetais, e no próprio homem. Assim, qualquer alimento, natural ou processado, pode estar ou não contaminado. As consequências de uma contaminação vão desde uma simples alteração do produto até toxinfecções graves no consumidor (AMORIM, 2013).

De acordo com dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde (2011), de 2000 a 2011, foram notificados 8.663 surtos de doenças causadas por patógenos veiculadas por alimentos responsáveis pelo adoecimento de 163.425 brasileiros, dos quais 112 foram a óbito (BRASIL, 2011). No entanto, devido à precariedade de informações disponíveis, em algumas regiões do país, pouco se sabe sobre a real magnitude deste problema.

No Brasil, o perfil epidemiológico das doenças causadas por patógenos veiculados por alimentos ainda é pouco conhecido, sendo este parâmetro restrito apenas a alguns estados e/ou municípios que apresentam estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (YAMAGUCHI, 2013).

Na década de 80 *L. monocytogenes* emergiu como um agente causador de uma doença veiculada por alimentos, caracterizada por casos de gastroenterite e, principalmente, septicemia, meningite e meningoencefalite nos casos mais graves. Devido à alta taxa de mortalidade que acarreta nos casos graves, esse micro-organismo é um agente que desperta atenção, especialmente das

autoridades governamentais responsáveis pelo controle sanitário e da comunidade científica da área de alimentos (CORTEZ, 2013).

Dentro de uma indústria de queijos, *L. monocytogenes*, por exemplo, é capaz de colonizar diversas áreas do ambiente de processamento, além dos equipamentos, utensílios, e até mesmo a salmoura, contaminando assim o produto final (CARLTON et al., 2005). A capacidade de contaminar queijos durante as etapas do processo justificam o fato de diversos surtos de listeriose estarem relacionados ao consumo deste produto alimentício. Dessa forma, o monitoramento de tal bactéria em laticínios é de extrema importância, desde que diversos surtos têm sido relacionados a produtos lácteos (PIETA, 2012).

Alguns fatores podem ser apontados como determinantes para o crescimento, multiplicação e sobrevivência de *Listeria* em alimentos, dentre eles: pH, temperatura, atividade de água, concentração salina, nitrito de sódio, conservantes e atmosfera. Os micro-organismos requerem nutrientes específicos para seu crescimento, como por exemplo, os aminoácidos e vitaminas, nutrientes estes presentes em queijo Minas Frescal, possibilitando assim o desenvolvimento deste patógeno no produto (SILVA, 2011).

Surto e casos de listeriose têm sido associados à presença de *L. monocytogenes* em diversos alimentos, tanto de origem vegetal como animal. Alguns alimentos têm sido frequentemente relacionados em casos de listeriose, como produtos vegetais, leite, produtos cárneos e seus derivados, destacando-se os produtos prontos para o consumo (BISNETO, 2012). Vários surtos de listeriose foram provocados pelo consumo de queijo contaminado, geralmente aqueles macios, frescos ou maturados e com bolores superficiais. Verificou-se que a causa da contaminação foi ou emprego de leite cru na fabricação dos produtos, ou contaminação pós-processamento (SILVA, 2010).

A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* é particularmente perigosa para gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do sistema imunológico. Contudo, a doença pode

ocasionalmente ocorrer em indivíduos não predispostos. Idosos e recém-nascidos também são susceptíveis à listeriose e enquadrados como indivíduos de alto risco (KIRINUS, 2010).

Em 2011, um surto de listeriose foi relatado, causado pela ingestão de melões deteriorados, culminando com 21 óbitos e 109 pessoas infectadas. Tal episódio atingiu 24 estados americanos. Além disso, durante o ocorrido, uma grávida ficou doente e sofreu um aborto espontâneo, que é característico da infecção por *Listeria*. O número de mortes se iguala a outro surto causado por contaminação da carne de um mesmo processador, no estado do Michigan e se estendeu por todo o país, com duração de cerca de um ano.

Queijos com altos teores de umidade como o Minas Frescal, por exemplo, não são recomendados para pessoas pertencentes aos grupos de risco de listeriose, ou seja, pessoas com sistema imunológico mais sensível, principalmente as mulheres grávidas, devido à grande possibilidade de contaminação a partir do seu consumo. Este tipo de queijo é alvo de grande preocupação à saúde pública, em função da sua relação com a ocorrência de surtos de listeriose. Isso se deve principalmente ao fato de que *L. monocytogenes* já foi isolada de diferentes amostras de Queijo Minas Frescal no Brasil, elaborados com leite cru e leite pasteurizado (BRITO et al., 2008). Sendo assim, torna-se relevante o estudo de métodos de redução deste micro-organismo em queijos.

## **2.4 BACTERIÓFAGOS E SUA UTILIZAÇÃO NO BIOCONTROLE**

### **2.4.1 Bacteriófagos**

Bacteriófagos são vírus específicos de bactérias, sendo parasitas intracelulares obrigatórios por falta de metabolismo próprio. São extremamente hospedeiro-específicos, capazes somente de infectar espécies específicas ou até mesmo grupos dentro de uma mesma espécie (RAKHUBA et al., 2010).

Os fagos não possuem metabolismo próprio e, por esse motivo, necessitam da maquinaria metabólica dos seus hospedeiros para se replicarem (SOUZA, 2012). São considerados candidatos lógicos à avaliação como agentes para o controle espécie-específico de bactérias patogênicas durante as fases de pré e pós-processamento e armazenamento de alimentos. São parasitas intracelulares obrigatórios, que utilizam as bactérias para sua multiplicação; logo, são componentes da microbiota natural da produção de alimentos, desde o campo até a comercialização do produto final. São estáveis nesses ambientes e prontamente recuperados de solo, efluentes, água, fezes e alimentos (ROSSI & ALMEIDA, 2010).

Bacteriófagos ao infectarem as bactérias, podem levar a dois eventos: 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 (MARIETTO-GONÇALVES et al., 2014).

Como todos os vírus, os bacteriófagos são compostos de DNA ou RNA recobertos por uma capa de proteína chamada capsídeo. Podem apresentar ácido nucléico de fita simples ou dupla e, em alguns bacteriófagos, o capsídeo é coberto por uma cauda contendo lipídios que desempenha, provavelmente, a função da aderência do bacteriófago à parede das células hospedeiras (ROSSI, 2011).

Muitos bacteriófagos possuem elementos estruturais na parte distal de sua cauda, alguns formam uma placa basal com uma a seis fibras, enquanto outros bacteriófagos contêm proteínas e ácidos não nucléicos em seus capsídeos (SIMÃO, 2011).

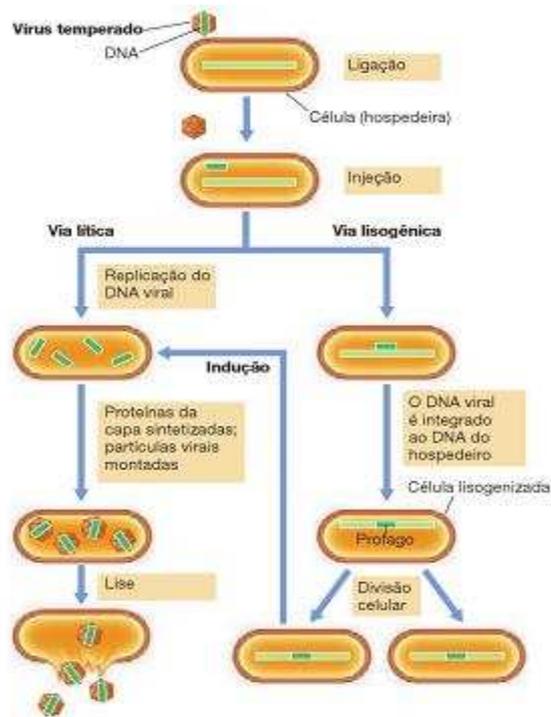
Os bacteriófagos são partículas virais pequenas, com tamanho entre 20 a 200 nm, possuindo um ácido nucléico. Este genoma fica armazenado em um capsídeo e em alguns casos possuem um envelope composto por lipídeos (O'Flaherty, 2009).

A capacidade de atuar sobre determinados grupos específicos de bactérias, sem ultrapassar as fronteiras de espécie ou gênero e, por conseguinte, não afetar micro-organismos desejáveis nos alimentos, e interferir na microbiota normal do trato gastrointestinal são características favoráveis para aplicação de fagos em biocontrole. Além disso, os bacteriófagos estão, em geral, presentes em altas concentrações em água e alimentos de diferentes origens, podendo ser encontrados em diferentes produtos em população na ordem de  $10^8$  UFP·g<sup>-1</sup> (SULAKVELIDZE e BARROW, 2005).

#### **2.4.2 Ciclo de infecção de bacteriófagos**

O ciclo de infecção de um bacteriófago é caracterizado basicamente em dois tipos: o lisogênico e o lítico. Bacteriófagos são quimicamente atraídos pelas bactérias e em seguida penetram na parede celular liberando seu material genético DNA ou RNA. No ciclo lisogênico, o material genético permanece no citoplasma, o vírus se comporta morfologicamente como plasmídeo, mantendo seu material na bactéria e continua presente em sua multiplicação (ABEDON, 2008).

Hagens et al., (2010) descreve o ciclo lítico e suas etapas, sendo o início do ciclo de infecção marcado pelo reconhecimento por um receptor primário da célula hospedeira, seguido pela adsorção em um segundo receptor. A primeira adesão pode ser reversível, caso a célula não esteja viva. Já a segunda adesão é irreversível, onde o DNA fágico circulariza e a bactéria inicia a produção de proteínas fágicas. As proteínas fágicas produzidas sequestram a célula hospedeira e induzem a célula bacteriana a produzir novos fagos. A figura 1 representa o ciclo de infecção de bacteriófagos líticos e lisogênicos.



**Figura1.** Ciclos de Infecção de bacteriófagos líticos e lisogênicos (MADIGAN, 2015)

As proteínas fágicas promovem o rompimento celular logo após a reunião da progênie fágica. A lise celular resulta na liberação de novos bacteriófagos, prontos para iniciar o novo ciclo. Essa quebra é facilitada também pelo acúmulo de enzimas que enfraquecem a parede e a membrana bacteriana, além da pressão exercida pelo aumento da quantidade de partículas no interior da bactéria (ABEDON, 2008).

Abedon, (2008) descreve um ciclo controverso, conhecido como ciclo pseudolisogênico, onde o bacteriófago, após infectar a bactéria produz uma resposta instável e não produtiva, não havendo a lisogênese. Neste caso o genoma do bacteriófago é mantido no interior da bactéria por tempo indeterminado. Acredita-se que isso ocorra devido a falhas na replicação do genoma ou por falta de nutrientes para a bactéria hospedeira, fazendo com que o bacteriófago não consiga retirar energia e substratos para sua replicação.

### 2.4.3 Aplicação de bacteriófagos no biocontrole de patógenos

Ao longo dos últimos anos, apesar dos recentes avanços tecnológicos no controle de patógenos em alimentos, os consumidores têm procurado alimentos naturais, ou seja, os alimentos submetidos a tratamentos menos agressivos, sem conservantes químicos. Além disso, o uso extensivo de sanificantes levou ao desenvolvimento de bactérias resistentes, tornando estes procedimentos menos eficazes (ROSSI, 2011).

Sillankorva et al., (2010) comprovou a eficiência da utilização de uma solução contendo bacteriófagos na redução de biofilmes e que não são necessários tempos de exposição prolongados para que um fago seja capaz de eficientemente reduzir a população bacteriana.

Desde de 2006, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) aprovou a comercialização do bacteriófago Listex™ P100 (fago P100) para controle de listeria em plantações e em alimentos, (USFDA, 2006; USFDA, 2007), sendo que o mesmo tem demonstrado eficácia contra diversas estirpes de *L. monocytogenes* (SONI & NANNAPANENI, 2010<sub>b</sub>).

Uma das principais vantagens da utilização de bacteriófagos como alternativa em biocontrole é a sua especificidade para controlar uma espécie-alvo, sem interação com outros micro-organismos presentes no alimento (GREER, 2005). Além disso, são fáceis de obter e aplicar, não causam quaisquer mudanças sensoriais nos alimentos e são capazes de sobreviver ao resfriamento e congelamento. Contudo, alguns fatores como as interações entre bacteriófagos e seus hospedeiros, o efeito sobre o ambiente e obstáculos presentes no próprio alimento, como estrutura e pH, devem ser melhor estudados e compreendidos (HUNGARO, 2010).

Soni et al., (2012) avaliaram os efeitos individuais e combinados de fago preparação Listex™ P100, arginato láurico e uma mistura de diacetato de lactato de sódio e potássio (PL-SD) contra o crescimento a frio *L.*

monocytogenes em queijo fresco. Em seus resultados puderam observar que o bacteriófago Listex™ P100 além de ser estável na presença de arginato láurico e PL-SD, o tratamento combinado de Listex™ P100 com PL-SD reduziu a contagem de *L. monocytogenes* iniciais em 2-4 ciclos log UFC/cm<sup>2</sup> e também manteve a contagem de *L. monocytogenes* reduzida durante o período de 28 dias a 4 °C.

Chibeu et al., (2013) também avaliaram a eficiência do bacteriófago Listex™ P100 adicionado individualmente e associado com conservantes químicos na conservação de carne de peru. Neste estudo foram inoculados 10<sup>3</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> *L. monocytogenes* e 10<sup>7</sup> UFP·mL<sup>-1</sup> de bacteriófago e foi avaliado sua eficácia com o uso de conservantes químicos. Foi possível observar em seus resultados a eficácia desde bacteriófago em reduzir a contagem de *L. monocytogene* em carne assada de peru armazenada a 10 °C ao longo de 28 dias e de forma mais intensa nos primeiros 14 dias de armazenamento.

Oliveira et al., (2014) avaliaram a eficácia deste mesmo bacteriófago na redução de *L. monocytogenes* em melão, pêra e maçã, na forma de sucos e fatias armazenadas a 10 °C obtendo resultados satisfatórios quanto a redução deste micro-organismo pela ação do bacteriófago ao longo de 8 dias de armazenamento. No estudo, as frutas e sucos foram tratados com 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e 10<sup>8</sup> UFP·mL<sup>-1</sup> do bacteriófago. Dos tratamentos, o mais eficaz foi o aplicado ao melão, seguido da pêra, mas nenhum efeito foi observado sobre os produtos da maçã. As reduções decimais na concentração da bactéria foram por volta de 1 e 1,5 ciclos logarítmicos no melão e em pêras fatiadas respectivamente. Em sucos, foram obtidas reduções maiores de *L. monocytogenes* em suco de melão de 8,0 ciclos logarítmicos, seguido de pêra de 2,10 ciclos logarítmicos, ambos após 8 dias de armazenamento. O suco de maçã não foi afetado pelo tratamento com fago. Os autores comentam que baixo pH da maçã pode ter sido o fator diferencial para que a concentração de *L. monocytogenes* não tenha sido afetado pela ação dos bacteriófagos.

Os bacteriófagos têm sido propostos como uma alternativa interessante aos antibióticos em saúde animal, como bioconservadores em alimentos, e como ferramentas para a detecção de bactérias patogênicas em toda a cadeia alimentar (ROSSI, 2011). Tendo assim um grande potencial para uso como controle biológico de patógeno em alimentos (HUNGARO, 2013).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Departamento Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, nos Laboratórios de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica – LAMPOAH e o Laboratório de Química e Análise de Alimentos.

#### **3.1 Micro-organismos**

Nesta pesquisa foram testadas quatro estirpes *L. monocytogenes*, sendo uma cultura referência ATCC 30090, uma cultura isolada de ambientes de laticínios, doada pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa – MG (Scott A), uma cultura isolada de ambiente de indústria processadora de carnes e por fim, uma cultura isolada de melões doada pelo laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – MG.

Os bacteriófagos utilizados foram isolados de intestinos de galinha caipiras oriundas da Zona Rural de Viçosa – MG. Após o isolamento, os bacteriófagos foram testados quanto a sua especificidade nas culturas de *L. monocytogenes* selecionadas para pesquisa.

#### **3.2 Isolamento e purificação do bacteriófago**

Para a pesquisa e isolamento do bacteriófago foram analisadas 68 amostras de diversas fontes, incluindo, 15 amostras de água residuária de

ambientes de laticínios, 8 de água residuária de indústria processadora de carnes, 12 amostras de água residuária de curral, 10 amostras de esgoto não tratado, 10 amostras de queijos produzidos com leite cru comercializados na feira artesanal de Viçosa, MG, 11 amostras de intestinos de frangos de granja e duas amostras de intestino de galinhas caipiras oriundas da zona rural de Viçosa, MG.

### **3.2.1 Isolamento de bacteriófagos**

Para o isolamento de bacteriófagos líticos de *L. monocytogenes* foi utilizada a metodologia adaptada de Sambrook; Russel (2001) e Atterbury et al., (2005). Foram pesados 10 g de amostra sólida ou medidos 10 mL amostra líquida, sendo diluídos em tampão SM (Tris-HCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e gelatina) na proporção 1:1 / 1:10 respectivamente. A suspensão foi então homogeneizada em shaker (OLAB- SL 221) sob agitação de 150 rpm a 37 °C por 24 horas, para permitir a eluição do bacteriófago para o tampão.

Após este período, uma alíquota de 10 mL da suspensão foi transferida para um tubo esterilizado de centrífuga (Beckman, J2-MC, rotor JA 20), onde foram adicionados 2 mL de NaCl 5 mol L<sup>-1</sup> e mantidos sob refrigeração a 4 °C por uma hora. A suspensão foi submetida à centrifugação em centrífuga a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi recuperada em outro tubo esterilizado de centrífuga e foi adicionado 10 % de PEG (Polietileno glicol) e a suspensão foi mantida novamente sob refrigeração por 24 horas. Após esse período, a suspensão foi novamente centrifugada a 11.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 10 mL de tampão SM. Após uma hora em temperatura ambiente, foram adicionados 15 % de clorofórmio em relação ao volume da amostra (v/v) e logo após a solução foi centrifugada em centrífuga a 3000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase

aquosa foi recuperada em tubos de ensaio esterilizados até o anel formado, no qual possivelmente continha os fagos.

Nas tentativas de isolamento, diferentes concentrações de clorofórmio foram testadas, 5 %, 10 % e 15 %, sendo que na concentração de 15 % (v/v) os resultados foram mais satisfatórios.

### **3.2.2 Avaliação do isolamento dos bacteriófagos**

Para avaliar a presença de fagos nas suspensões obtidas, foi utilizada a técnica de microgotas proposta por Adams (1959). As culturas de *L. monocytogenes* foram cultivadas por 24 horas a 37 °C em caldo Triplicaseísa e soja – TSB (Fluka - São Paulo, Brasil). Um volume de 0,1 mL de cada suspensão da estirpe foi misturado com 5 mL de sobrecamada fundida aproximadamente a 45 °C de ágar TSA (TSB + 0,7 % Ágar – ágar), e vertidos em placa de Petri contendo ágar base TSA (TSB + 1,2 % Ágar). Após a solidificação, 10 µL de cada suspensão de fagos foram depositados sobre a superfície na forma de microgotas. As placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 18 horas para a verificação da formação de placa de lise, indicando a presença de fagos efetivos para *L. monocytogenes* na suspensão testada.

### **3.2.3 Purificação dos bacteriófagos**

A purificação dos fagos foi realizada utilizando a metodologia de Grajewski, Kusek e Gelfand (1985). Um volume de 100 µL da suspensão de fagos foi misturado com 100 µL da cultura de *L. monocytogenes*, com aproximadamente  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup>, cultivada previamente em caldo TSB por 6 a 9 horas. A suspensão resultante foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação, a suspensão foi transferida para tubos contendo 5 mL de meio semi-sólidos de ágar TSA , essa mistura foi vertida

em placa contendo ágar TSA. As placas foram incubadas a 37 °C, por aproximadamente, 18 horas.

Após o período de incubação, uma placa de lise foi selecionada e removida com o auxílio de uma pipeta tipo Pasteur e depositada em 5 mL de cultura ativa de *L. monocytogenes*, crescida em caldo TSB por 12 horas. Essa mistura foi reincubada por 24 horas a 37 °C e posteriormente centrifugada em centrífuga (Beckman -J2-MC- rotor JA 20) a 3.000 g por 15 minutos a 4 °C e filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Três ciclos de purificação foram realizados, a fim de garantir a pureza dos fagos isolados.

### **3.2.4 Propagação dos bacteriófagos**

As suspensões de fagos obtidas foram propagadas segundo metodologia adaptada de Kudva et al., (1999). A propagação foi procedida adicionando-se sobre as placas de Petri com lises positivas 10 mL de solução tampão SM. As placas devidamente fechadas foram incubadas a 37 °C, sob agitação de 150 rpm em shaker (OLAB- SL 221) por 24 horas. Após este período, uma alíquota de aproximadamente 8 mL foi retirada da placa e transferida para um tubo esterilizado onde a solução foi centrifugada à 3000 g por 15 minutos a 4 °C (Centrífuga Beckman -J2-MC- rotor JA 20). Em seguida, a suspensão foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. O filtrado foi armazenado em tubo de ensaio esterilizado com capacidade de 20 mL e mantido sob refrigeração a 4 °C até a utilização.

### 3.2.5 Titulação dos bacteriófagos

Na determinação da concentração de bacteriófagos, foi utilizado tampão SM para realizar as diluições necessárias, a fim de obter contagem de Unidades Formadoras de Placas (PFU) entre 10 a 100 placas de lise por mL de suspensão (CARRILO et al., 2005). Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de *L. monocytogenes* em fase log juntamente com 100  $\mu\text{L}$  do bacteriófago em um frasco contendo 5 mL de sobrecamada de ágar TSA (0,7 % de ágar-ágar). Esta sobrecamada foi vertida em placas contendo ágar TSA já sólido. As placas de lise foram determinadas após período de 15 a 18 horas de incubação a 37 °C. Após este período, foi realizada contagem do número de placas de lise e calculado o título dos bacteriófagos em UFP·mL<sup>-1</sup>.

## 3.3 Delineamento Experimental

### 3.3.1 Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura

O experimento foi disposto em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 9, sendo 4 tratamentos assim estudados:

**Controle** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*

**Lm + F5** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de  $10^5$  UFP·mL<sup>-1</sup>.

**Lm + F6** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de  $10^6$  UFP·mL<sup>-1</sup>.

**Lm + F8** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de  $10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup>.

A cada 3 horas, durante 24 horas, foram realizadas a contagem de *L. monocytogenes* totalizando nove tempos (0; 3 h; 6 h; 9 h; 12 h; 15 h; 18 h; 21 h e 24 h).

Para cada concentração de fago estudada, o experimento seguiu o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) tendo como fator o tempo de crescimento (0; 3 h; 6 h; 9 h; 12 h; 15 h; 18 h; 21 h e 24 h). Todo o experimento foi realizado em três repetições experimentais.

### **3.3.2 Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de *L. monocytogenes* em leite simulando a condição de fabricação de queijo Minas Frescal**

Para avaliar o crescimento de *L. monocytogenes* em leite adicionado de ácido láctico, cloreto de cálcio e cloreto de sódio visando simular a mesma condição no processo de fabricação de queijo Minas Frescal o experimento foi disposto no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 x 9, sendo 5 tratamentos assim estudados:

**Controle** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* no leite.

**L2** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* no leite adicionado de ácido láctico, sal e cloreto de cálcio.

**L3** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e no leite adicionado de ácido láctico, sal e cloreto de cálcio e fago com título de  $10^5$  UFP·mL<sup>-1</sup>.

**L4** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e no leite adicionado de ácido láctico, sal e cloreto de cálcio e fago com título de  $10^6$  UFP·mL<sup>-1</sup>.

**L5** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e no leite adicionado de ácido láctico, sal e cloreto de cálcio e fago com título de  $10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup>.

A cada três horas, durante 24 horas, foram realizadas a contagem de *L. monocytogenes* totalizando nove tempos (0; 3 h; 6 h; 9 h; 12 h; 15 h; 18 h; 21 h e 24 h).

Na contagem de fagos o experimento seguiu o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) disposto em esquema fatorial 2 x 9 tendo como fatores técnica de contagem de fagos (microgotas e placas de lise) e o fator tempo de crescimento (0; 3 h; 6 h; 9 h; 12 h; 15 h; 18 h; 21 h e 24 h). Todo o experimento foi realizado em três repetições experimentais.

### **3.3.3 Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal em duas temperaturas de armazenamento**

O experimento foi montado no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) disposto em esquema de parcela subdividida. Na parcela tem-se um fatorial 2 x 4, com dois níveis para temperaturas de armazenamento (5 °C e 15 °C) e 4 níveis de tratamentos assim estabelecidos:

**Controle:** Queijo produzido sem adição de *L. monocytogenes* e fago.

**Lm+Q1** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* no leite utilizado na fabricação de queijo Minas Frescal.

**Lm + Q5** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de  $10^5$  UFP·mL<sup>-1</sup> no leite utilizado na fabricação de queijo Minas Frescal.

**Lm + Q6** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de  $10^6$  UFP·mL<sup>-1</sup> no leite utilizado na fabricação de queijo Minas Frescal.

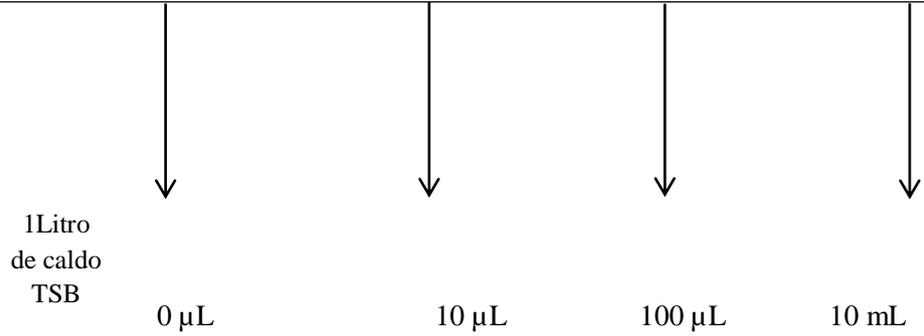
**Lm + Q8**- Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de  $10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup> no leite utilizado na fabricação de queijo Minas Frescal.

Para cada tempo e temperatura de armazenamento uma amostra de queijo foi retirada para contagem de *L. monocytogenes* e bacteriófagos. Na subparcela tem-se o tempo de armazenamento (1 dia, 7 dias, 14 dias e 21 dias) e as interações do tempo com a temperatura de armazenamento e os tratamentos. Todo experimento foi realizado em três repetições experimentais.

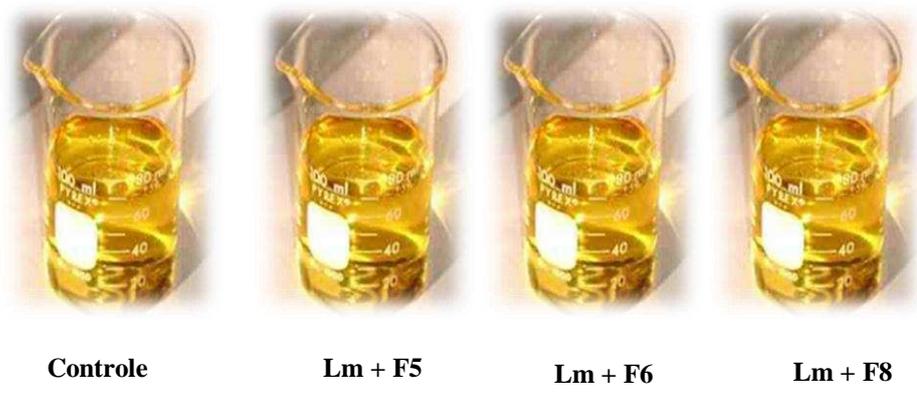
### **3.4 Esquema de distribuição dos tratamentos para avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de *L. monocytogenes* em caldo meio de cultura**

Em béqueres esterilizados foram transferidos 1000 mL de caldo TSB previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Cada béquer recebeu um tratamento, sendo estes distribuídos da seguinte forma:

0,1 mL de *L. monocytogenes* na concentração de  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup>



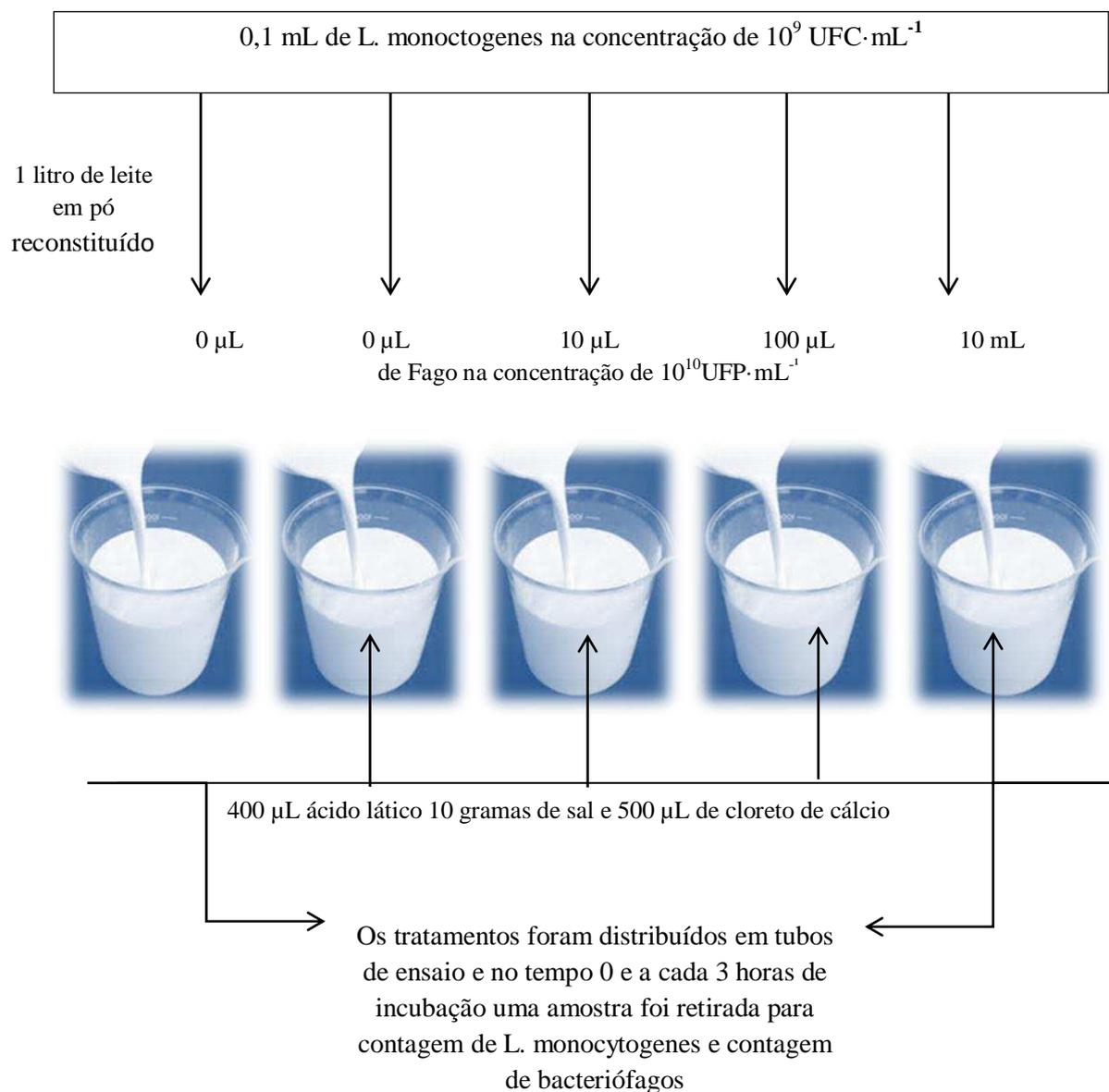
Fago na concentração de  $10^{10}$  UFP·mL<sup>-1</sup>



Os tratamentos foram distribuídos em tubos de ensaio e no tempo 0 e a cada 3 horas de incubação uma amostra foi retirada para contagem de *L. monocytogenes* e contagem de bacteriófagos

### 3.5 Esquema de distribuição dos tratamentos para avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de *L. monocytogenes* em leite

Em béqueres esterilizados foram transferidos 1000 mL de leite em pó reconstituído 10 % (v/v) esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Os tratamentos foram distribuídos nos béqueres da seguinte forma:



### **3.6 Elaboração do Queijo Minas Frescal com diferentes concentrações de Bacteriófagos**

Os queijos Minas Frescal foram elaborados em condições laboratoriais. Para cada tratamento e temperatura de armazenamento, foram distribuídos em béqueres esterilizados de cinco litros, quatro litros de leite pasteurizado (65 °C por 30 min), padronizado (3,2 % de gordura) e resfriado a 40 °C. Uma alíquota de amostra foi coletada para análise confirmar a ausência de bactérias do gênero *Listeria* no leite. Em seguida foram adicionados ao leite 2,0 mL da solução de cloreto de cálcio a 50 % (m/v), 1,25 mL de ácido láctico a 10 % (v/v) e 40 gramas cloreto de sódio (1 % em reação ao volume de leite).

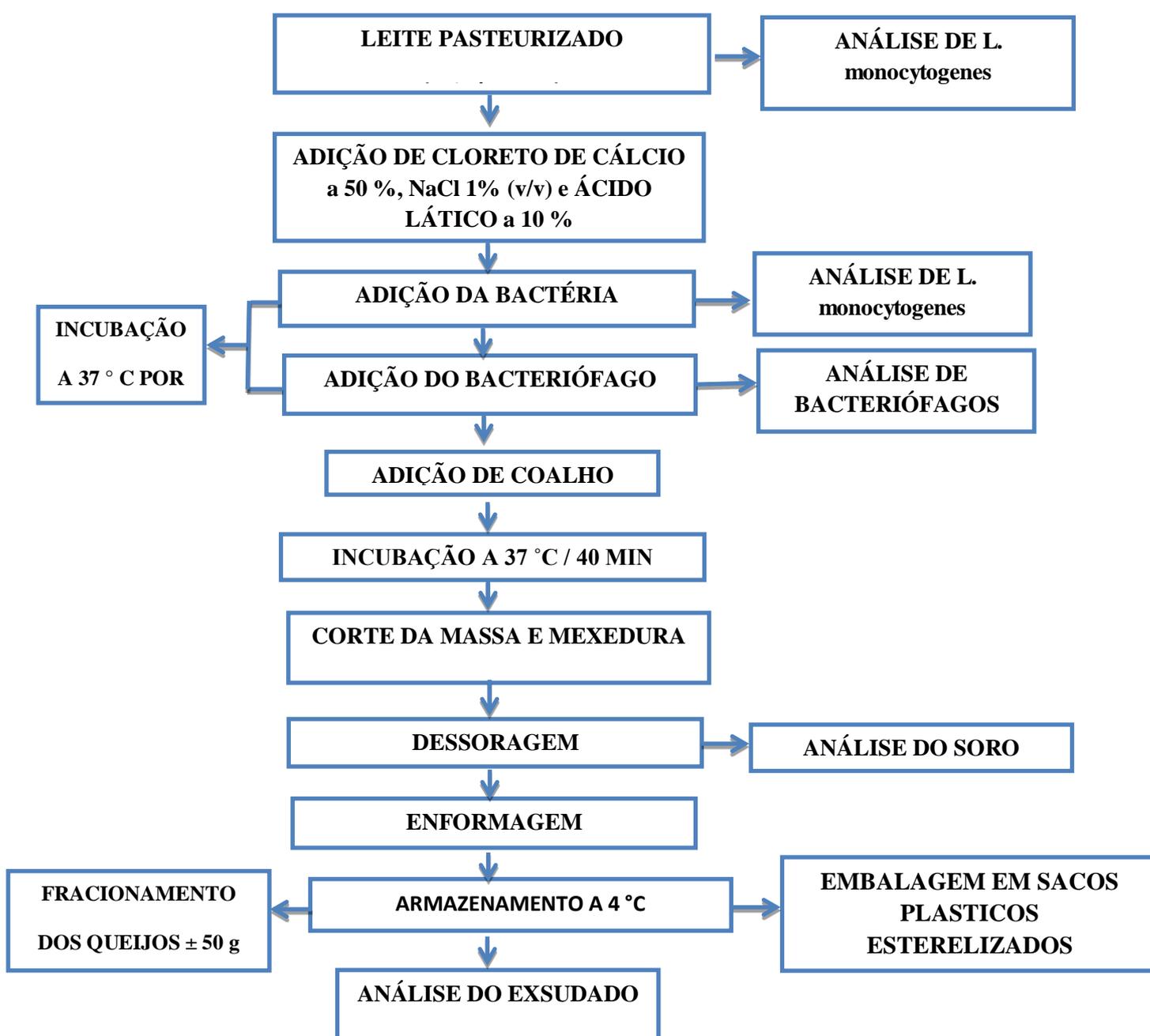
Foram inoculados ao leite um volume de 0,4 mL de cultura de *L. monocytogenes* previamente ativada e na concentração  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup> com intuito de obter uma concentração final de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> no leite.

Os fagos foram adicionados ao leite, conforme as concentrações estabelecidas para os tratamentos Q5, Q6 e Q8, para cada tratamento os volumes de 0,04 mL, 0,4 mL e 40 mL foram adicionados ao leite respectivamente. Após 30 minutos uma alíquota de leite foi coletada para contagem da bactéria e fagos para confirmar a presença destes nas concentrações estabelecidas de  $10^5$  UFP·mL<sup>-1</sup>;  $10^6$  UFP·mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Após este período foi adicionado o coalho seguindo as recomendações do fabricante. Os béqueres foram colocados em banho-maria em temperatura de 37 °C por 40 min.

Foi procedido o corte da massa, repouso, mexedura e dessoragem em condições assépticas. A massa foi colocada em formas de queijos de polipropileno de 250 g previamente esterilizadas (121 °C por 15 min) seguindo de 3 viragens em condições assépticas. Amostras de soro de queijo foram coletadas para as análises microbiológicas.

Os queijos foram mantidos dentro das formas a 4 °C de um dia para o outro para ocorrer a dessoragem. Na sequencia os queijos quarteados em

unidades experimentais com cerca de 50 g cada e acondicionados em embalagens plásticas (sacos stomacher) esterilizadas com capacidade de 250 g e armazenados nas temperaturas testes durante 21 dias. A Figura 3 representa de forma simplificada o processo de fabricação do queijo Minas Frescal.



**Figura 2-** Fluxograma das etapas de fabricação do queijo Minas Frescal em escala laboratorial.

### **3.7 Avaliação da atividade do bacteriófago pela variação da densidade óptica**

A atividade dos bacteriófagos foi determinada por medida da absorbância em espectrofotômetro (Biospectro SP - 22) a 600 nm, em intervalos de três horas durante um período de 24 horas. Para tanto, no tempo zero e a cada três horas de incubação a 37 °C, após a calibração do equipamento, 2 mL de cada solução contendo os diferentes tratamentos, foram transferidos para cubetas de quartzo e procedeu-se a leitura. Todas as análises foram feitas em duplicata.

### **3.8 Análises Microbiológicas**

#### **3.8.1 Contagem de *L. monocytogenes***

##### **3.8.1.1 Enumeração de *L. monocytogenes* crescida em Caldo Triplicaseína (TSB)**

Para contagem de *L. monocytogenes* em caldo TSB, 100 µL de cada tratamento foram distribuídos em eppendorfs contendo 900 µL de solução salina peptonada e assim realizadas diluições decimais e seus respectivos plaqueamentos por superfície, onde 100 µL de cada diluição foram distribuídos e espalhados em placas contendo ágar Palcan (Fluka, São Paulo, Brasil), que posteriormente foram incubadas a 37 °C ± 1 °C por 24 a 48 horas.

Este procedimento foi repetido a cada 3 horas de incubação, durante um período de 24 horas. A contagem de *L. monocytogenes* se deu em placas da mesma diluição com contagens entre 30 e 300 colônias e expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC·mL<sup>-1</sup>).

### **3.8.1.2 Enumeração de *L. monocytogenes* em leite, soro e exsudado**

Para a contagem de *L. monocytogenes* no leite, soro e exsudado um volume de 25 mL foram coletados anteriormente à produção de queijo, durante o processo de dessoragem do queijo e um dia após a fabricação dos queijos, respectivamente.

Todas as amostras foram homogeneizadas por agitação e inoculadas em 225 mL de solução salina peptonada esterilizada (8,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl e 1 g.L<sup>-1</sup> peptona) seguido de incubação a 37 °C ( $\pm$  1 °C) 24 horas. Posteriormente, as amostras foram agitadas e procederam-se as diluições decimais onde 100  $\mu$ L de cada tratamento foram distribuídas em eppendorfs contendo 900  $\mu$ L de solução salina peptonada. De cada diluição, uma alíquota de 100 $\mu$ L foi distribuída em placas contendo ágar Palcan (Fluka, São Paulo, Brasil), que posteriormente foram incubadas a 37 °C  $\pm$  1 °C por 24 a 48 horas. Para a contagem utilizou-se placas da mesma diluição com número de colônias entre 30 e 300.

Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC·mL<sup>-1</sup>). Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

### **3.8.1.3 Enumeração de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal**

Para a realização desta análise foram retiradas porções aleatórias das frações do queijo de cada tratamento, totalizando 25 g de cada amostra pesados diretamente em saco stomacher de 500 mL. Foram adicionados 225 mL de solução salina peptonada esterilizada (8,5 g L<sup>-1</sup> NaCl e 1 g L<sup>-1</sup> peptona) seguido de incubação a 37 °C ( $\pm$  1 °C) por 24 horas.

Após este período as amostras foram homogeneizadas por 3 minutos e um volume de 100  $\mu$ L de cada tratamento foram distribuídos em

ependorfs contendo 900  $\mu\text{L}$  de solução salina peptonada e assim realizadas diluições decimais. Logo após, 100 $\mu\text{L}$  de cada diluição foram distribuídos e espalhados em placas contendo ágar Palcan (Fluka, São Paulo, Brasil), as placas incubadas a  $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. Após o período de incubação a contagem das placas foi procedida em placas da mesma diluição com número de colônias entre 30 e 300 e os resultados foram expressos em  $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ . Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

### **3.8.2 Contagem de bacteriófagos**

#### **3.8.2.1 Contagem de bacteriófagos em Caldo Tryptic Soy Broth - TSB**

A contagem de fagos foi realizada pela técnica de microgotas, onde 10 mL de cada tratamento foram centrifugadas a 3000 g por 15 minutos (Beckman, J2-MC, rotor JA 20) posteriormente foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Após a obtenção da suspensão de fagos foram realizadas microgotas das diluições em placas contendo ágar TSA acrescido de 5 mL de sobrecamada de ágar TSA (0,7 % ágar- ágar) contendo 100  $\mu\text{L}$  de cultura de *L. monocytogenes* incubados anteriormente por 12 horas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . A determinação do título do fago se deu após período de 15 a 18 horas de incubação a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  observando a diluição da última placa com lise evidente.

#### **3.8.2.2 Contagem de bacteriófagos em leite, soro e exsudado**

A contagem de bacteriófagos no leite, soro e exsudado foi determinada por duas técnicas diferentes, microgotas e plaqueamento. Nas duas técnicas amostras de 10 mL de cada tratamento das diferentes amostras foram misturadas a tampão SM (Tris-HCl, NaCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e

gelatina) na proporção 1:1, centrifugadas (Centrífuga Beckman, J2-MC, rotor JA 20) a 3000 g por 15 minutos posteriormente foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm.

Após a obtenção da suspensão de fagos foram realizadas microgotas das diluições em placas contendo ágar TSA acrescido de 5 mL de sobrecamada de ágar TSA (0,7 % ágar- ágar Himedia, Curitiba - Paraná, Brasil) contendo 100 µL de cultura de *L. monocytogenes* incubados anteriormente por 6 - 9 horas a 37 °C . A determinação do título do fago se deu após período de 15 a 18 horas de incubação a 37 °C observando a diluição da última placa com lise evidente.

Na técnica de contagem, 500 µL de *L. monocytogenes* em fase log cultivada em caldo TSB (Fluka - São Paulo, Brasil) a 37 °C por 6-9 horas foram adicionados juntamente a 100µL da suspensão de bacteriófago em 5 mL de sobrecamada de ágar TSA (TSB + 0,7 % de ágar-ágar, Himedia®, Curitiba – Paraná, Brasil). Esta sobrecamada foi vertida em placas contendo TSA (TSB + 1,5 % ágar-ágar). As placas de lise foram determinadas após período de 15 a 18 horas de incubação a 37 °C. Após este período, procedeu a contagem do número de placas de lise e foi calculado o título dos bacteriófagos em UFP·mL<sup>-1</sup>.

### **3.8.2.3 Contagem de bacteriófagos em queijo Minas Frescal**

Para a contagem de bacteriófagos nos queijos cerca de 10 g de queijo dos diferentes tratamentos foram homogeneizados em tampão SM (Tris-HCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e gelatina) e posteriormente centrifugados (Centrífuga Beckman, J2-MC, rotor JA 20) a 3000 g a 4 °C por 20 minutos. A suspensão foi transferida para tubos de centrífuga esterilizados e a estes foram adicionados clorofórmio a 15% (v/v), os tubos foram novamente centrifugados a 3000 g a 4 °C por 20 minutos (Beckman, J2-

MC, rotor JA 20). A fase aquosa foi recuperada em tubo de ensaio esterilizado até o anel formado.

A fim de obter o título do bacteriófago pela técnica de migrogotas, foram realizadas diluições decimais da suspensão distribuindo 100 µL do fago em 900 µL de tampão SM (Tris-HCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e gelatina) em eppendorfs previamente esterilizados. De cada diluição foram realizadas migrogotas em ágar TSA (TSB + 1,5 % de ágar-ágar) previamente adicionado de 100 µL de cultura ativa, em fase log, cultivada em caldo TSB (Fluka - São Paulo, Brasil) a 37 °C, por 6-9 horas. A determinação do título do fago se deu após período de 15 a 18 horas de incubação a 37 °C observando a diluição da última placa com lise evidente.

A contagem de bacteriófagos pela técnica de contagem de placas de lise se deu adicionando 500 µL de *L. monocytogenes* em fase log, cultivada em caldo TSB a 37 °C, por 6 a 9 horas, juntamente a 100 µL da suspensão de bacteriófago em 5 mL sobrecamada de ágar TSA com 0,7 % de ágar-ágar e dispostos sobre a superfície de ágar base TSA. As placas de lise foram determinadas após período de 15 a 18 horas de incubação a 37 °C. Após o período de incubação, procedeu a contagem do número de placas de lise e foi calculado o título dos bacteriófagos em UFP·g<sup>-1</sup>.

### **3.8.3 Caracterização Física e química do queijo Minas Frescal Fabricado**

Foram realizadas análises físicas e químicas do queijo fabricado. Foi determinado o teor de gordura, proteína, sólidos totais, umidade e foi medido o pH das amostras segundo a metodologia estabelecida por Pereira et al., (2001).

## **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos do estudo da eficiência de bacteriófagos no controle da população de *L. monocytogenes* em meio de cultura, em leite simulando as condições de processamento de queijo Minas Frescal e queijos estocados em duas temperaturas diferentes de armazenamento foram interpretados por análise de variância (ANOVA).

Para comparar as médias dos tratamentos fixando o tempo foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância de 5 %. As médias das temperaturas de armazenamento dos queijos foram comparadas entre si utilizadas o teste t-student com nível de significância de 5 % de probabilidade.

Para comparar as médias de tratamento entre queijos contendo bactéria + fago e tratamento contendo apenas bactéria, para cada tempo de estocagem e temperatura foi utilizado o teste t-student com nível de significância de 5 % de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SAS (SAS Institute, version 9.3, Cary, NC, USA) licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Isolamento, purificação, propagação e titulação do bacteriófago de *L. monocytogenes***

Das 68 amostras analisadas, em apenas duas amostras foram identificadas a presença do bacteriófago para *L. monocytogenes* (Tabela 3). As fontes pesquisadas foram escolhidas partindo do fato de que bacteriófagos são os micro-organismos mais abundantes no meio ambiente, com uma grande variedade de ambientes onde podem ser encontrados, como por exemplo, solo,

água, esgoto, fezes de animais, entre outros. As amostras e suas respectivas fontes estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Avaliação da presença de bacteriófagos em diversas fontes e suas respectivas origens.

<b>Fonte</b>	<b>Número de Amostras</b>	<b>Origem</b>	<b>Presença de Fago</b>
	8	Indústria processadora de carnes	-
<b>Água residuária</b>	15	Ambientes de Laticínios	-
	12	Curral	-
<b>Esgoto não tratado</b>	10	Zona Rural de Tocantins – MG	-
<b>Queijo fabricado com Leite cru</b>	10	Feira artesanal de Viçosa, MG	-
<b>Intestinos de frango de granja</b>	11	Indústria processadora de carnes	-
<b>Intestinos de Galinha Caipira</b>	2	Zona Rural de Viçosa	+

(+) Amostras com presença de bacteriófagos (-) Amostras sem a presença de bacteriófagos

Após o isolamento do bacteriófago, sua atividade lítica foi avaliada em diferentes culturas de *L. monocytogenes*, incluindo uma cultura isolada de ambientes de indústria de processamento de carnes, uma cultura referência ATCC 30090 e a cultura (Scotte A) e uma cultura isolada de melões doada pelo laboratório de Higiene de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Para escolha da cultura de *L. monocytogenes* a ser utilizada nos testes em meio de cultura, em leite e em queijos, foi verificado a velocidade de formação de lises e o diâmetro das placas de lises. O bacteriófago LisIGC demonstrou eficiência em todas as culturas testadas, tendo apresentado resultados mais

eficientes na cultura Scotte A, formando lises evidentes entre 6 e 8 horas de incubação a 37 °C e diâmetro das lises variando de 2 a 3 cm, sendo, portanto a cultura selecionada para os demais testes desta pesquisa. Nas demais culturas testadas a formação de lise deu-se entre 12 e 18 horas e o diâmetro das mesmas variavam entre 1 e 2 cm. Posteriormente a escolha da cultura de *L. monocytogenes* a ser utilizada, procedeu-se a purificação e propagação e posteriormente determinação do título. Após cinco propagações, alcançou-se o título de  $10^{10}$  UFP. g<sup>-1</sup>.

O bacteriófago isolado foi nomeado de LisIGC. A figura 3 representa placas de lises formadas pelo bacteriófago em meio TSA após 8 horas de incubação a 37 °C.



**Figura 3:** Exemplos de Placas de lise formadas pelo bacteriófago LisIGC de *L. monocytogenes* isolado de intestino de galinha caipira.

## **5.2 Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura**

O estudo da atividade do bacteriófago LisIGC no crescimento de *L. monocytogenes* foi realizado em caldo TSB condições controladas de temperatura.

Os resultados do teste *in vitro* evidenciaram redução significativa ( $P < 0,05$ ) da absorbância, medida em espectrofotômetro (Biospectro SP - 22) a 600 nm, durante o período de incubação de 24 horas (Tabela 4). Observou-se também uma variação na absorbância ao longo deste período demonstrando oscilação entre o crescimento da bactéria, o efeito lítico do bacteriófago e uma retomada do crescimento da bactéria em alguns períodos (Figura 4A).

Hagens e Loessner (2010) relataram que esse comportamento ocorreu em resposta à presença de células resistentes ao bacteriófago ou a alteração de ciclo de infecção lítico para lisogênico. A retomada do crescimento bacteriano em cultivos na presença de bacteriófagos, segundo Rossi et al., (2010) se deve, em alguns casos, à possíveis mutações da bactéria e desenvolvimento de resistência em resposta atividade lítica do fago.

Durante o crescimento da cultura de *L. monocytogenes* ocorreu um aumento de células no meio o que conseqüentemente contribuiu para um aumento na absorbância. Entretanto em alguns períodos, devido à lise celular causada pela infecção fágica, ocorre redução da absorbância. Esse comportamento se repete ao longo do período de incubação analisado.

Em resposta à ação dos fagos, as bactérias têm desenvolvido mecanismos de proteção contra seus invasores em quase todas as fases do seu ciclo de vida. Esse mecanismo de defesa acontece através da mutação dos receptores de fagos na parede celular das bactérias ou através de secreções com função de barreira impedindo a abordagem do fago. Esta barreira consiste na formação de camada, na parede celular, com enzimas de restrição ou a formação de uma

camada com propriedade antiaderente que impede a adsorção dos fagos. Entretanto os fagos têm encontrado mecanismos de superação das barreiras imposta pelas bactérias que consistem em adaptação às células do hospedeiro a partir das modificações resultantes da interação do fago e hospedeiros. O vírus pode em alguns casos, carregar uma variante específica da bactéria de modo que a capacidade de se replicar em células da mesma linhagem possa ser melhorada.

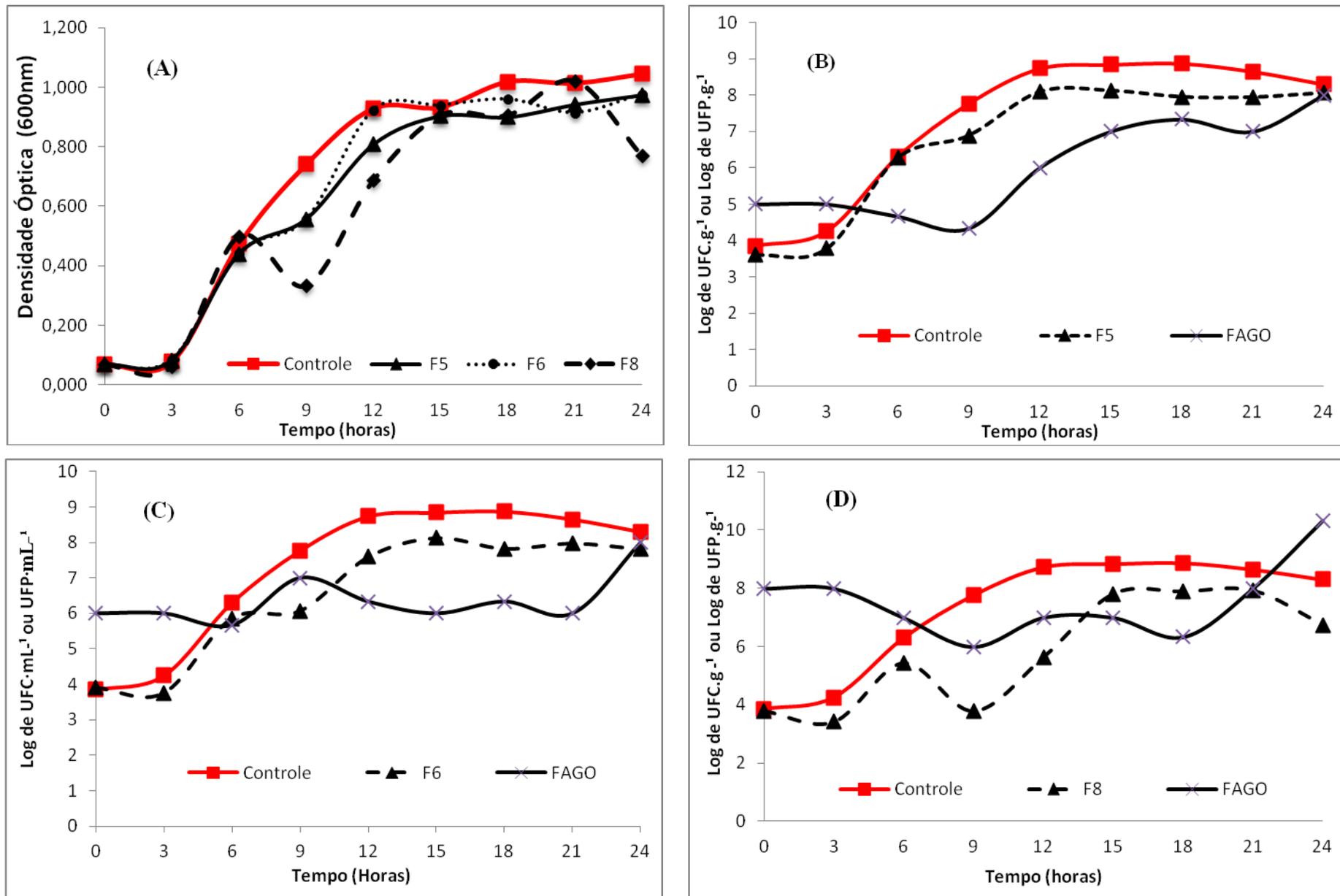
Durante o período entre zero e três horas, não foi observada variação da absorbância das amostras que receberam os tratamentos F5, F6 e F8 em relação a amostra controle. Este período é associado à fase lag do crescimento bacteriano, ou seja, fase de adaptação da bactéria ao meio e uma intensa atividade metabólica. No entanto entre 9 e 12 horas de incubação pode-se observar uma redução significativa ( $P < 0,05$ ), na absorbância nos tratamentos F5, F6 e F8 em relação ao controle.

Simão (2011) observou redução da absorbância, quando analisou estirpes de *Salmonellas* tratadas com diferentes concentrações bacteriófagos na durante o período de 14 horas. O mesmo autor atribui a redução da absorbância ao longo do tempo ao efeito lítico dos bacteriófagos nas células bacterianas.

**Tabela 4.** Valores médios (desvio padrão) densidade óptica a 600 nm e da contagem em placas de *L. monocytogenes* em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) durante 24 horas de incubação a 37 °C.

TEMPO	TRATAMENTO	D.O a 600 nm (Desvio Padrão)	CONTAGEM EM PLACA UFC·mL <sup>-1</sup> (Desvio Padrão)
0	Controle	0,069 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,84 ± 0,09 <sup>a</sup>
	F5	0,067 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,19 <sup>a</sup>
	F6	0,065 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,14 <sup>a</sup>
	F8	0,068 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,79 ± 0,43 <sup>a</sup>
3	Controle	0,079 ± 0,00 <sup>ab</sup>	4,24 ± 0,14 <sup>a</sup>
	F5	0,082 ± 0,00 <sup>ab</sup>	3,78 ± 0,20 <sup>a</sup>
	F6	0,086 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,07 <sup>a</sup>
	F8	0,063 ± 0,00 <sup>b</sup>	3,41 ± 0,27 <sup>a</sup>
6	Controle	0,474 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,30 ± 0,36 <sup>a</sup>
	F5	0,440 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,27 ± 0,24 <sup>a</sup>
	F6	0,442 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,82 ± 0,37 <sup>a</sup>
	F8	0,500 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,43 ± 0,30 <sup>a</sup>
9	Controle	0,741 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,76 ± 0,38 <sup>a</sup>
	F5	0,557 ± 0,05 <sup>b</sup>	6,88 ± 0,36 <sup>b</sup>
	F6	0,556 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,06 ± 0,23 <sup>b</sup>
	F8	0,333 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,78 ± 0,19 <sup>c</sup>
12	Controle	0,929 ± 0,05 <sup>ab</sup>	8,73 ± 0,51 <sup>a</sup>
	F5	0,808 ± 0,07 <sup>cb</sup>	8,09 ± 0,19 <sup>b</sup>
	F6	0,923 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,58 ± 0,33 <sup>bc</sup>
	F8	0,687 ± 0,03 <sup>c</sup>	5,62 ± 0,16 <sup>c</sup>
15	Controle	0,933 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,84 ± 0,36 <sup>a</sup>
	F5	0,903 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,12 ± 0,16 <sup>b</sup>
	F6	0,939 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,53 ± 0,27 <sup>b</sup>
	F8	0,905 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,79 ± 0,36 <sup>b</sup>
18	Controle	1,018 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,87 ± 0,26 <sup>a</sup>
	F5	0,900 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,95 ± 0,26 <sup>b</sup>
	F6	0,959 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,82 ± 0,36 <sup>b</sup>
	F8	0,905 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,88 ± 0,18 <sup>b</sup>
21	Controle	1,014 ± 0,04 <sup>a</sup>	8,65 ± 0,14 <sup>a</sup>
	F5	0,942 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,94 ± 0,24 <sup>b</sup>
	F6	0,914 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,97 ± 0,39 <sup>b</sup>
	F8	1,022 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,91 ± 0,46 <sup>b</sup>
24	Controle	1,044 ± 0,11 <sup>a</sup>	8,30 ± 0,46 <sup>a</sup>
	F5	0,974 ± 0,09 <sup>a</sup>	8,06 ± 0,14 <sup>a</sup>
	F6	0,977 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,81 ± 0,19 <sup>a</sup>
	F8	0,770 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,74 ± 0,37 <sup>b</sup>

**Controle** - Concentração de 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*. **Lm + F5** - Concentração de 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de 10<sup>5</sup> UFP· mL<sup>-1</sup>. **Lm + F6** - Concentração de 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de 10<sup>6</sup> UFP· mL<sup>-1</sup>. **Lm + F8** - Concentração de 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de 10<sup>8</sup> UFP· mL<sup>-1</sup>. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si.



**Figura 4.** Estudo da eficiência de bacteriófago no controle de população de *L. monocytogenes* em meio de cultura durante 24 horas de incubação a 37 °C. **A:** Variação da absorvância ao longo de 24 horas. **B:** F5- 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e de 10<sup>5</sup> UFP·mL<sup>-1</sup> fago. **C:** F6 - 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e de 10<sup>6</sup> UFP·mL<sup>-1</sup> fago. **D:** F7 - 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e de 10<sup>8</sup> UFP·mL<sup>-1</sup> fago. **Controle:** 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*

Na avaliação do controle da população de *L. monocytogenes* pelo bacteriófago LisIGC, observou-se também variação significativa ( $p < 0,05$ ) da contagem de *L. monocytogenes* durante 24 horas de incubação a 37 °C.

Durante a fase log de crescimento da bactéria, o fago apresentou melhor efeito controle da população de *L. monocytogenes* no meio (Figura 4B, 4C e 4D). No período entre 9 e 12 horas de incubação observou-se uma redução de 4,0 e 3,0 ciclos logarítmicos respectivamente quando aplicado o tratamento F8 em relação ao tratamento controle. Já nos tratamentos F5 e F6 a redução foi de aproximadamente 0,8 e 1,7 ciclos logarítmicos respectivamente em 9 horas e uma redução de 0,64 no tratamento F5 e 1,14 ciclos logarítmicos no tratamento F6 após 12 horas de incubação.

De uma maneira geral, os fagos infectam bactérias que se encontram em fase exponencial de crescimento, pois é nesta fase de crescimento bacteriano que toda a maquinaria metabólica da bactéria necessária à replicação dos fagos está em pleno funcionamento. Além disso, a fase crescimento exponencial só ocorre em locais ricos em nutrientes, garantindo assim que a progenia fágica vai encontrar outras células para se multiplicar.

Os resultados demonstraram aumento da contagem de bacteriófagos em alguns períodos analisados acompanhados de uma redução da contagem de *L. monocytogenes* e o inverso também foi observado. Essa relação está relacionada ao período de latência do fago, ou seja, intervalo de tempo que vai desde a infecção até o momento em que novos fagos são libertados.

Após a lise celular ocorre uma consequente redução na contagem de bactéria no meio e um aumento da concentração do fago, esse comportamento se repete de forma sucessiva durante o período analisado, sendo que durante a fase log de crescimento da bactéria esse comportamento se torna mais evidente.

Durante o ciclo lítico de um fago, podem ser liberados até 100 novas partículas virais devido à lise de apenas uma única bactéria e cada um desses novos

fagos podem infectar uma nova célula bacteriana. Assim, os sucessivos ciclos de infecção podem reduzir significativamente o número das bactérias susceptíveis ao fago, oscilando a concentração fago-bactéria no meio.

As diferentes concentrações de bacteriófagos apresentaram diferentes efeitos na redução da bactéria, sendo observado que maiores concentrações de fagos (tratamento F8) resultaram em um melhor efeito na redução nas populações de *L. monocytogenes*. Segundo Silva et al., (2014) a concentração inicial de fagos no momento da aplicação um fator importante para a eficácia na redução de populações microbianas, sendo que, maiores concentrações de fagos geram melhores resultados redução do hospedeiro. Essa relação pode ser explicada pelo fato que, em concentrações maiores de bacteriófagos, o número de hospedeiros infectados também é maior, reduzindo assim a população de *L. monocytogenes* no meio.

Segundo Kutter e Sulakvelidze (2005) o efeito entre a concentração de bacteriófagos e a concentração de hospedeiro é denominado Multiplicidade de Infecção (MOI) e é o que determina a eficiência na redução do hospedeiro, sendo que MOIs superiores a 10.000 são mais eficientes. Segundo Rossi et al. (2010) para que o contato dos bacteriófagos com as célula hospedeiras aconteça de forma hábil é necessário que o bacteriófago esteja em alta concentração no meio, o que permite que as partículas virais alcancem os receptores da célula e aumente assim a possibilidade do bacteriófago conseguir penetrar na célula bacteriana. Os mesmos autores relatam que em meios líquidos a infecção da célula causada pelo bacteriófago ocorre de forma mais eficiente do que em meios sólidos, devido principalmente ao fato de que as partículas virais poderem se difundir mais facilmente.

### **5.3 Avaliação da eficiência de bacteriófagos no crescimento de *L. monocytogenes* em leite simulando a condição de fabricação de queijo Minas Frescal**

No estudo da eficácia do bacteriófago no controle do crescimento de *L. monocytogenes* em leite foram observados resultados semelhantes ao estudo em meio de cultura.

A contagem de *L. monocytogenes* foi influenciada significativamente ( $P < 0,05$ ) pelas diferentes concentrações de bacteriófagos testadas (Figura 5, A, B e C). Esse comportamento pode ser justificado pelo fato de que os tratamentos aplicados respeitaram o MOI (Multiplicidade de Infecção) de 1, 10 e 1000, sendo no tratamento com MOI de 1000 (L8) observou-se melhores resultados no controle do crescimento de *L. monocytogenes*.

O tempo de incubação apresentou efeito significativo sobre contagem de *L. monocytogenes* e de bacteriófagos ( $P < 0,05$ ) no leite, evidenciando que as fases do crescimento microbiano, bem como as etapas do ciclo de infecção do bacteriófago influenciam na concentração destes micro-organismos no leite.

No processo de infecção os fagos induzem seu hospedeiro para sintetizar componentes que são necessárias para a montagem de novas partículas virais. Inicialmente liga-se a receptores específicos da bactéria-alvo, que podem ser proteínas, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, cápsula ou flagelo. O material genético do bacteriófago é injetado no interior da bactéria. Na replicação viral, o genoma do bacteriófago é transcrito pela RNA polimerase da bactéria hospedeira, gerando RNA mensageiro e redirecionando a maquinaria metabólica da bactéria para a formação de novas partículas virais, que se reúnem formando novos fagos, liberados após o rompimento da bactéria. Em meio líquido, como o leite, o contato dos fagos com as células hospedeiras

ocorre de forma mais eficaz do que em meios sólidos, facilitando o processo de infecção.

Semelhantemente ao estudo em meio de cultura, não foi observado efeito lítico do bacteriófago durante a fase lag do crescimento da cultura de *L. monocytogenes*, sendo que durante a fase log a redução da população bacteriana foi significativamente maior do que nos demais tempos de incubação analisados. Durante a fase de multiplicação celular as células bacterianas ficam mais susceptíveis a penetração do bacteriófago, rompimento da célula e consequente morte. Esse efeito foi observado em todas as concentrações de bacteriófagos testados.

No intervalo de tempo entre 0 e 3 horas não foi observado redução da contagem de *L. monocytogenes*, o mesmo comportamento foi observado na curva de crescimento do bacteriófago. Neste período as células de *L. monocytogenes* estavam na fase lag, ou seja, fase de intensa atividade metabólica e de adaptação ao meio. A não infecção do fago nesse momento pode ser devido à necessidade do bacteriófago de que as células hospedeiras estejam em alta concentração no meio, facilitando o processo de infecção.

Quando avaliado o efeito conjunto do sal, cloreto de cálcio e ácido láctico adicionado ao leite sobre o crescimento de *L. monocytogenes* e bacteriófago ao longo de 24 horas de incubação, observou-se que a concentração estes aditivos adicionadas ao leite não afetou significativamente a contagem de *L. monocytogenes* e a atividade do bacteriófago.

O pH da solução controle foi de 6,66 já a solução contendo as concentrações específicas de NaCl, cloreto de cálcio e ácido láctico na mesma proporção adicionada ao leite para fabricação de queijo, apresentou um pH de 6,13. Observou-se também, que quando comparado o tratamento controle ao tratamento L1, que o crescimento da cultura de *L. monocytogenes* não foi afetado pela concentração de NaCl, cloreto de cálcio e ácido láctico adicionado

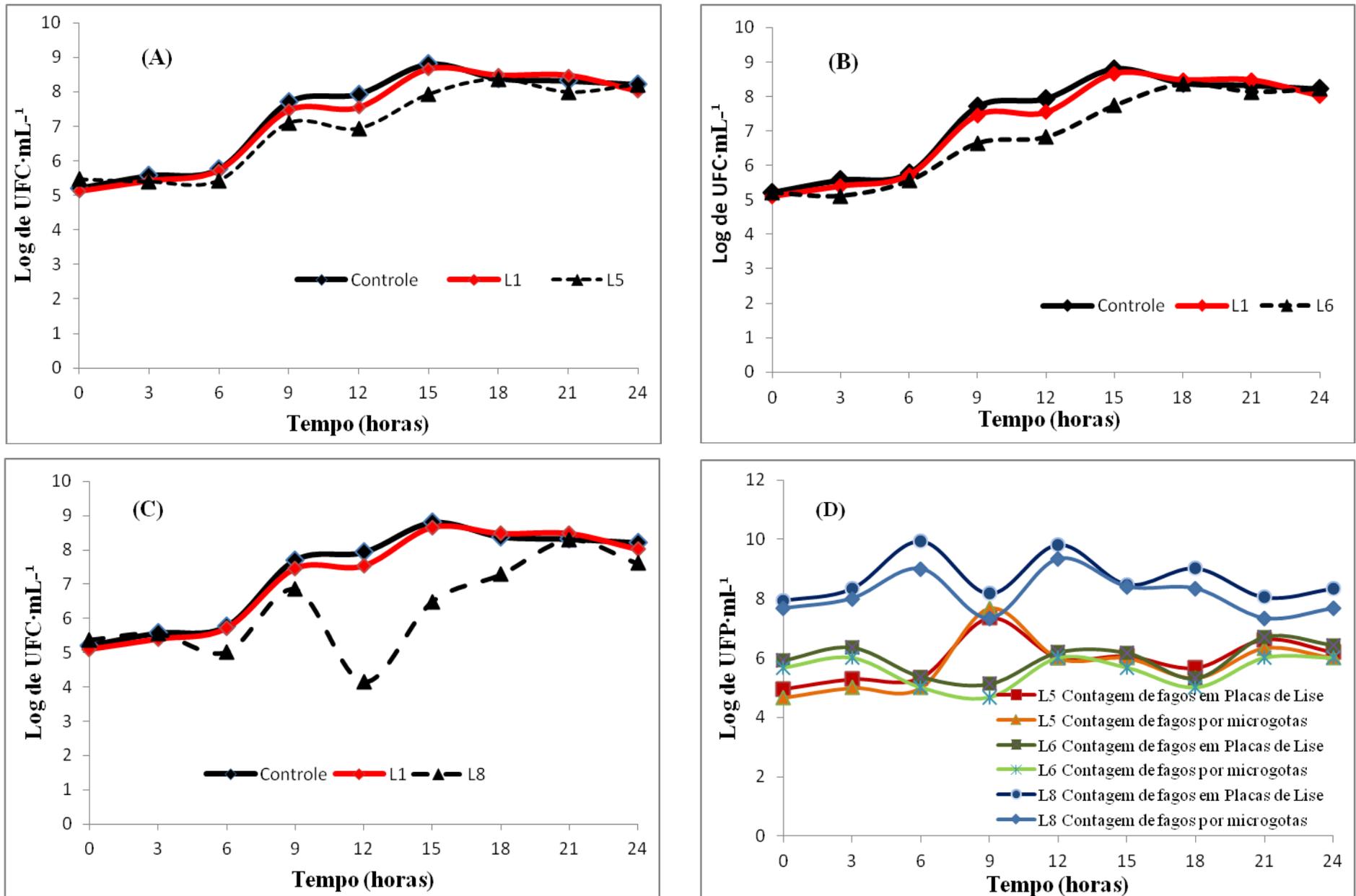
ao leite, indicando que esta pequena redução do pH no leite não foi suficiente para inibir o crescimento da cultura de *L. monocytogenes*.

Após 12 horas de incubação foi observada uma redução de 3,8 ciclos logarítmicos no tratamento L8 (Fago  $10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup> e Bactéria  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>) em relação ao tratamento controle (Bactéria  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>). Quando comparado o tratamento L8 ao tratamento L1 (Bactéria  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> + NaCl + Ácido Lático) a redução foi de 3,3 ciclos logarítmicos, indicando que a presença de NaCl e ácido láctico no leite não inibiu a atividade do bacteriófago.

Segundo Jeffrey, (2010) *L. monocytogenes* pode se desenvolver em alimentos com concentrações significativas de sal e ácido devido capacidade de induzir uma resposta tolerante ao ácido (ATR), ou seja, capacidade induzir uma resistência a pH mais baixo do que aquele que poderia ser letal.

Na Figura 5 observa-se uma oscilação do crescimento da cultura de *L. monocytogenes* e do bacteriófago, indicando comportamento semelhante ao estudo in vitro, ou seja, a presença de células resistentes ao bacteriófago e as diferentes etapas do ciclo de infecção.

Durante o período de incubação os tratamentos L5, L6 e L8 apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento controle e o tratamento L1.



**Figura 5.** Estudo da eficiência de bacteriófago no controle de população de *L. monocytogenes* em leite adicionado de sal, ácido lático e cloreto de cálcio durante 24 horas de incubação a 37 °C. **Controle** - Concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* no leite. **L1** - Concentração de  $10^5$  UFC· mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* no leite adicionado de ácido lático, sal e cloreto de cálcio. **L5** - Concentração de  $10^5$  UFC· mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* + ácido lático, sal e cloreto de cálcio e fago com título de  $10^5$  UFP·mL<sup>-1</sup> no leite. **L6** - Concentração de  $10^5$  UFC· mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* + ácido lático, sal e cloreto de cálcio e fago com título de  $10^6$  UFP mL<sup>-1</sup> no leite.

A contagem de bacteriófagos foi determinada por duas técnicas diferentes, contagem de placas de lise e titulação por microgotas e estas técnicas foram comparadas entre si. Os resultados demonstraram que apenas no tratamento L8 houve diferença significativa entre as técnicas, indicando que a técnica de contagem só tem efeito significativo quando a concentração de fago tem três MOI de diferença da concentração da bactéria no leite (Figura 5D).

Os resultados também demonstraram que o tempo de incubação tem um efeito significativo na contagem de fagos, independente da técnica escolhida. A quantidade de fago no leite variou, de acordo com a quantidade de células hospedeiras, com a fase de crescimento da bactéria e o estágio do ciclo de infecção do fago. A curva de crescimento de fagos começa com um período de latência ou eclipse, semelhante à fase lag bacteriana. A próxima fase é chamada a fase de maturação ou de libertação (semelhante à fase log em bactérias) quando novas partículas de fago são reunidas e libertadas. O ciclo pode então começar de novo com a infecção de novas células.

Quando um fago infecta uma bactéria, vários fatores são relevantes para o sucesso da infecção e número de novas partículas liberadas. Esse número está condicionado, por exemplo, ao estado nutricional da bactéria, se o fago utiliza ao máximo a maquinaria metabólica bacteriana para a sua reprodução ou se as funções codificadas pelos fagos como polimerases e proteínas reguladoras essenciais são realizadas corretamente. A não eficiência de alguns desses fatores pode limitar o tamanho explosão e conseqüentemente a quantidade de fagos liberados após a infecção.

## **5.4 Efeito do tratamento com bacteriófago na sobrevivência de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal durante estocagem sob refrigeração**

### **5.4.1 Análises microbiológicas do leite inoculado de *L. monocytogenes* e bacteriófagos, do soro de leite e do exsudado proveniente da fabricação de queijo Minas Frescal**

Foi realizada a contagem de *L. monocytogenes* no leite dos mesmos no leite 30 minutos sendo que as amostras de leite utilizado na fabricação dos queijos Minas Frescal apresentaram a ausência de *L. monocytogenes*. Essa análise foi de suma importância para garantir que a contagem de *L. monocytogenes* no queijo foi unicamente oriunda da inoculação inerente aos tratamentos.

Na Tabela 5 encontram-se os valores médios da contagem de *L. monocytogenes* e fagos nas amostras de leite intencionalmente contaminados com *L. monocytogenes*, nas amostras de soro coletadas logo após a fabricação dos queijos e do exsudado um dia após a fabricação dos queijos.

A contagem de *L. monocytogenes* apresentou média de 5,18 Log UFC· mL<sup>-1</sup> no leite, um aumento médio de 0,18 Log UFC· mL<sup>-1</sup> em relação ao valor estimado para inoculação no leite de 5,0 Log UFC· mL<sup>-1</sup>. Houve um aumento de 0,4, Log UFP·mL<sup>-1</sup>; 0,6 Log de UFP· mL<sup>-1</sup> e 0,8 Log UFP· mL<sup>-1</sup> em relação ao valor estimado de 5 Log UFP· mL<sup>-1</sup>; 6 Log UFP· mL<sup>-1</sup> e 8 Log UFP· mL<sup>-1</sup>, respectivamente na contagem de fago.

O soro de leite obtido da fabricação dos queijos apresentou valores de contagem de *L. monocytogenes* que variaram de 4,9 Log UFC·mL<sup>-1</sup> a

5,6 Log UFC· mL<sup>-1</sup>. A contagem de fago variou entre 6,3 Log UFP·mL<sup>-1</sup> e 9,36 Log UFP·mL<sup>-1</sup> nos diferentes tratamentos aplicados. Os valores encontrados no soro de leite foram próximos ao valor encontrado no leite, isso porque durante o processo de dessoragem, uma parte dos micro-organismos inoculados ficam retidos na massa e uma parte migra para o soro.

Baseado nos valores médios da contagem de *L. monocytogenes* verificou-se que o tratamento Lm+Q8 demonstrou efeito significativo no controle da multiplicação da bactéria no exsudado dos queijos, o que indica a ação lítica do fago sob a bactéria durando o período de armazenamento. Nos demais tratamentos não houve diferença significativa.

**Tabela 5.** Contagem média (desvio-padrão) de *L. monocytogenes* (Log de UFC· mL<sup>-1</sup>) e título do fago (UFP· mL<sup>-1</sup>) em leites, soros de leites obtidos da fabricação dos queijos e exsudado para os diferentes tratamentos do experimento.

Tratamento	Leite		Soro de leite		Exsudado	
	L. monocytogenes	Fago	L. monocytogenes	Fago	L. monocytogenes	Fago
Lm+Q1	5,4 (0,12)	-	4,9 (0,31)	-	5,42 (0,18)	
Lm + Q5	5,01 (0,22)	5,4(0,2)	5,55 (0,28)	6,36(0,45)	6,45 (0,10)	4,88(0,21)
Lm + Q6	5,22 (0,18)	6,6(0,2)	5,62 (0,12)	7,69(0,32)	6,62 (0,31)	5,93(0,17)
Lm + Q8	5,12 (0,14)	8,7(0,1)	4,08 (0,23)	9,16(0,12)	4,89 (0,22)	8,83(0,15)

**Lm+Q1:** inoculação inicial no leite de 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* para fabricação de queijo Minas frescal com a bactéria; **Lm +Q5:** inoculação inicial no leite de 10<sup>5</sup> UFC · mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de 10<sup>5</sup> UFP· mL<sup>-1</sup> para fabricação de queijo Minas frescal com a bactéria e o fago;

**Lm +Q6:** inoculação inicial no leite de 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de 10<sup>6</sup> UFP· mL<sup>-1</sup> para fabricação de queijo Minas frescal com a bactéria e o fago; **Lm +Q8:** inoculação inicial no leite de 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e fago com título de 10<sup>8</sup> UFP· mL<sup>-1</sup> para fabricação de queijo Minas frescal com a bactéria e o fago.

#### 5.4.2 Caracterização física e química do Queijo Minas Frescal Produzido

Na Tabela 6 estão dispostos os resultados da caracterização física e química do queijo Minas Frescal produzido e a caracterização segundo Martins et al., (2012) e Silva et al., (2008).

Os resultados demonstram que o queijo fabricado apresentou características físicas e químicas semelhantes às encontradas na literatura.

**Tabela 6.** Composição média do queijo Minas Frescal fabricado e de diferentes autores.

	Queijo Fabricado	Martins et al., (2012)	Silva et al., (2008)
<b>Gordura (%)</b>	20,9	23,5	28,98
<b>Proteína (%)</b>	17,94	19,5	23,8
<b>Cinzas (%)</b>	-	2,4	1,83
<b>Umidade (%)</b>	55,05	56,3	61,67
<b>Sólidos Totais (%)</b>	44,5	43,6	38,33
<b>pH</b>	6,34	6,65	6,42

#### 5.4.3 Contagem de *L. monocytogenes* e bacteriófagos em queijo Minas Frescal em diferentes temperaturas durante 21 dias de armazenamento

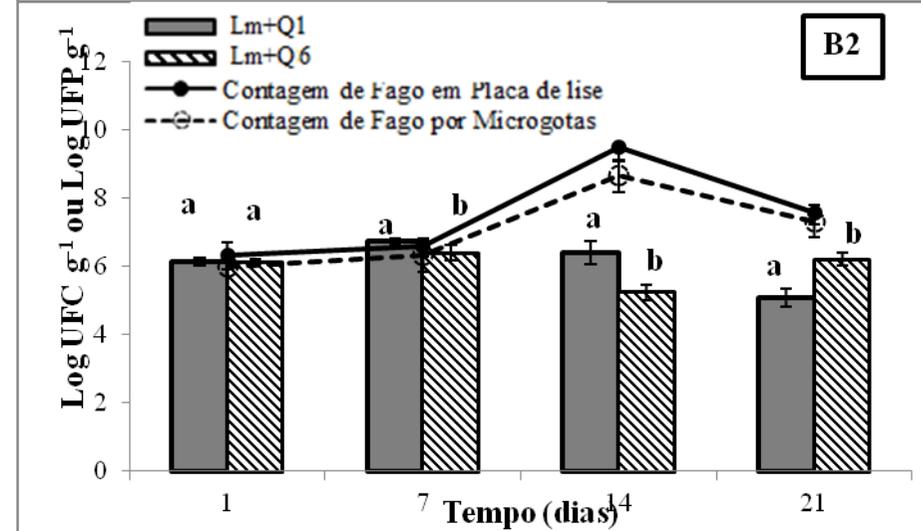
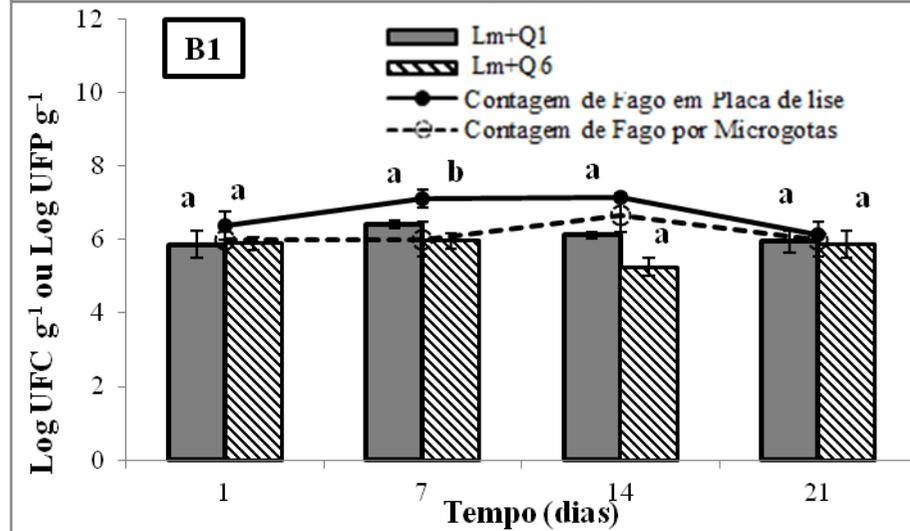
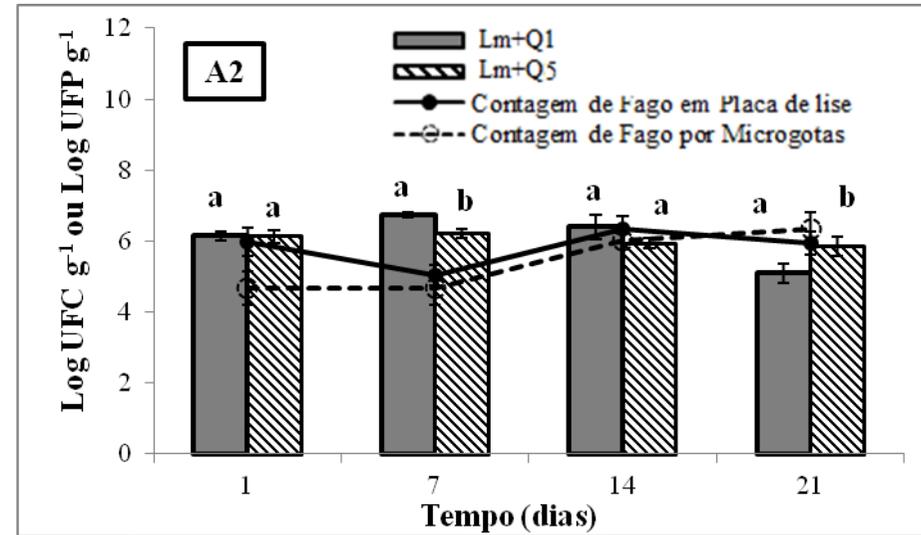
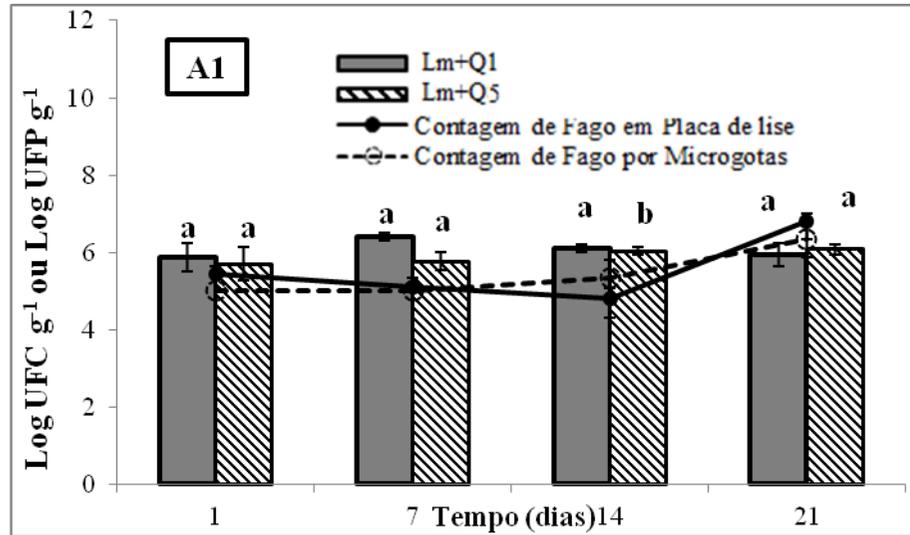
O crescimento de *L. monocytogenes* a 5 °C e a 15 °C durante a estocagem dos queijos Minas Frescal tratados com bacteriófagos está representada na Figura 6. Os resultados demonstram uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) da contagem de *L. monocytogenes* ao longo dos 21

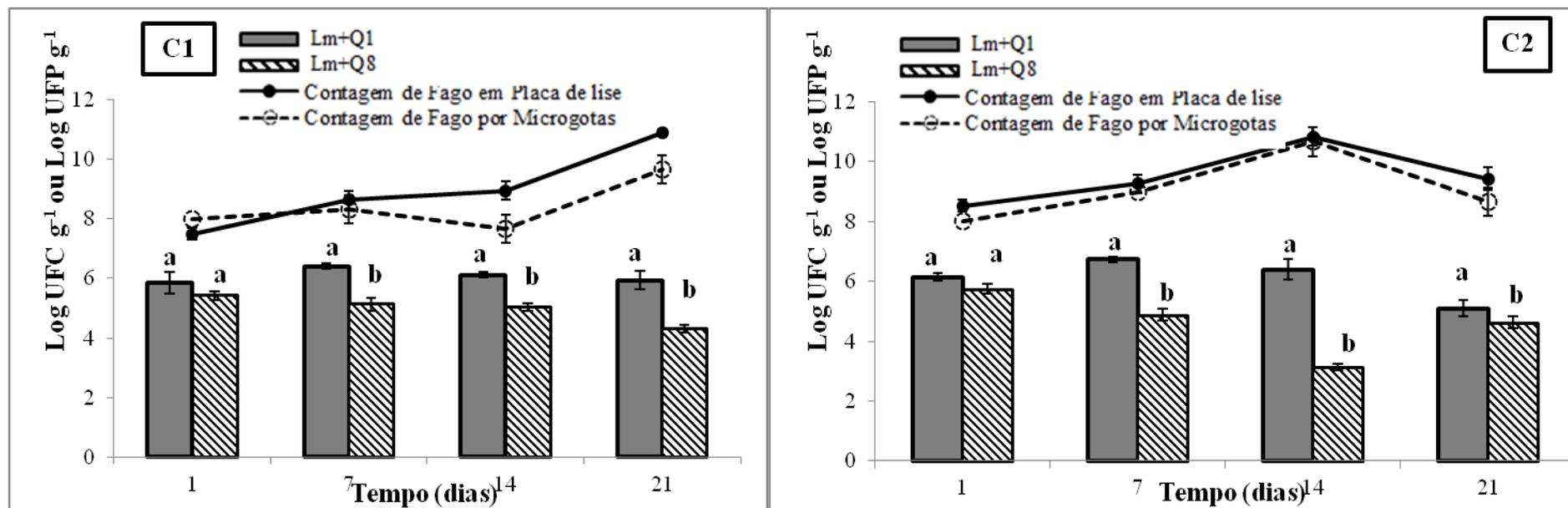
dias de incubação nas duas temperaturas de armazenamento. Sendo que a redução na contagem de *L. monocytogenes* foi significativamente maior na temperatura de 15 °C (Figura 6).

A temperatura de armazenamento é um importante fator de conservação, pois seleciona a microbiota capaz de se desenvolver e deteriorar um produto. Vale ressaltar que *L. monocytogenes* é classificada como um micro-organismo psicrotófico e tem capacidade de se desenvolver, mesmo que lentamente, em temperaturas de refrigeração. Assim, em temperaturas próximas à temperatura ótima de crescimento da bactéria, a multiplicação ocorreu de forma mais eficaz e consequente ocorreu um aumento da concentração de células hospedeiras no meio, facilitando a infecção pelo bacteriófago. Isso explica o fato de que o controle da população de *L. monocytogenes* na temperatura de 15 °C foi mais eficiente.

Segundo Ramos (2013) os bacteriófagos permanecem viáveis mesmo em baixas temperaturas e podendo causar infecção e redução da população do seu hospedeiro.

A contagem de bacteriófagos também foi influenciada significativamente pelo tempo de armazenamento do queijo. Não foi observada a atividade lítica do bacteriófago nos primeiros sete dias de incubação em nenhum dos tratamentos aplicados. Já após o período de quatorze dias de inoculação observou-se uma redução de 3,26 ciclos logarítmicos na temperatura de 15 °C e 1,07 ciclos logarítmicos na temperatura de 5 °C quando aplicado o tratamento Lm+Q8. Esses resultados indicam que a concentração do bacteriófago e a temperatura de armazenamento influenciaram na redução da contagem da população de *L. monocytogenes*.





**Figura 6:** Variação da contagem de listeria e fago durante 21 dias de armazenamento de queijos Minas Frescal.

**A1:** Lm+Q1 Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* (Armazenamento a 5 °C). **A2:** Lm+Q1 Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* (Armazenamento a 15°C).

**B1:** Lm+Q5: Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* +  $10^5$  fago (Armazenamento a 5 °C). **B2:** Lm+Q5- Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* +  $10^5$  fago (Armazenamento a 15 °C).

**C1:** Lm+Q6: Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* +  $10^6$  fago (Armazenamento a 5 °C). **C2:** Lm+Q6: Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* +  $10^6$  fago (Armazenamento a 15 °C).

**D1:** Lm+Q6: Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* +  $10^8$  fago (Armazenamento a 5 °C). **D2:** Lm+Q6: Inoculação de  $10^5$  de *L. monocytogenes* +  $10^8$  fago (Armazenamento a 15 °C).

Os queijos Minas Frescal devem ser mantidos sob refrigeração durante seu período de validade, mantendo assim, suas características sensoriais e reduzindo a chance de deterioração pela ação de micro-organismos, mas vale ressaltar que inúmeros estabelecimentos habitualmente desligam as gôndolas de refrigeração durante a noite, expondo esse tipo de produto, irregularmente, em temperaturas superiores a de refrigeração. Por isso nesta pesquisa, o estudo da eficiência do bacteriófago foi realizado avaliando a temperatura de refrigeração de 5 °C e a temperatura abusiva de 15 °C.

Como pode ser observado da Figura 6 o tratamento Lm+Q8, ou seja, fago na concentração de  $10^8$  foi o tratamento mais eficiente no controle da população *L. monocytogenes* diferindo significativamente dos demais tratamentos. Os tratamentos Lm+Q5 e Lm+Q6 com concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  de fago respectivamente não diferem entre si e quando comparados ao tratamento sem a presença de fago os também não foi possível observar diferença significativa na contagem de *L. monocytogenes*.

A eficiência do bacteriófago no controle de populações de *L. monocytogenes* no queijo é peculiar uma vez que em matrizes sólidas a eficácia do bacteriófago é pequena, entretanto vale ressaltar que as inoculações da bactéria e do fago foram feitas no leite e passaram por um pequeno período de incubação, o que facilitou a infecção e o aumento de bacteriófagos no queijo. Outro fato relevante é a liberação de exsudado pelo queijo durante o armazenamento. Esse líquido mesmo que em volume pequeno, contém *L. monocytogenes* e fago, o que pode influencia na contagem dos mesmos no queijo ao longo do tempo.

Guenther, 2009 em sua pesquisa verificou reduções de até 2,3 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* em amostras de queijo muçarela tratadas com bacteriófagos no período de 13 dias a 6 °C. O mesmo autor comparou concentrações de  $10^6$  e  $10^8$  verificando que concentrações de  $10^8$  UFP·g<sup>-1</sup>

de bacteriófagos foram mais eficientes no controle de *L. monocytogenes* em leite achocolatado e em cachorro-quente, deixando as contagens abaixo no nível de detecção no período de 6 dias de estocagem a 6 °C.

Makino et al.,( 2005) e Silva et al., (2014) descrevem o queijo como um alimento com grande potencial para o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, principalmente pela disponibilidade de nutrientes e o maior devido ao aumento da quantidade de manipulação. Entretanto o fato das bactérias alvo estarem incorporado dentro das matrizes alimentares complexas, protegendo-a, aumenta a dificuldade de difusão de partículas dos bacteriófagos e conseqüentemente a sua capacidade de infecção (GUENTHER, 2009).

#### **5.4.4 Contagem de Bacteriófagos em queijo Minas Frescal por duas técnicas diferentes**

Para a contagem de bacteriófagos foi utilizada duas técnicas diferentes, e estas comparadas entre si. As técnicas avaliadas foram à técnica tradicional de contagem de placas de lise e a determinação do título do bacteriófago pela técnica de microgotas, onde se determina o título do fago observando a última diluição em que o fago apresentou lise evidente.

A Figura 6 apresenta os resultados da contagem de bacteriófagos por duas técnicas, em duas temperaturas diferentes e ao longo de 21 dias. Os resultados que as técnicas apresentam o mesmo comportamento em todos os tratamentos e nas duas temperaturas estudadas.

## 6. CONCLUSÃO

A pesquisa de bacteriófagos de *L. monocytogenes* foi bem sucedida, em amostras de intestino de galinha caipira oriundas da zona rural de Viçosa, MG. O bacteriófago isolado foi eficaz no controle de populações de *L. monocytogenes* quando testado em meio de cultura, em leite e em queijo Minas Frescal.

O teste da eficácia dos bacteriófagos em leite com ácido láctico, sal e cloreto de cálcio na proporção das adicionadas ao leite para produção de queijo Minas Frescal, demonstrou que as concentrações adicionadas não influenciaram a atividade do bacteriófago.

Foi verificado que as diferentes concentrações de bacteriófagos testadas surtiram efeitos diferentes na contagem de *L. monocytogenes* tanto no estudo em meio de cultura como em leite e queijo. Sendo que os tratamentos com concentração de  $10^8$  UFP·g<sup>-1</sup> foram mais eficientes que os demais tratamentos em todas as matrizes testadas.

Na avaliação do efeito da temperatura na atividade do bacteriófago em queijos Minas Frescal observou-se que a temperatura de armazenamento dos queijos tem efeito significativo na contagem de *L. monocytogenes* e de bacteriófagos ao longo dos 21 dias de armazenamento. Sendo que a temperatura de 15 °C foi mais eficiente no controle do crescimento. Foi constatado que as técnicas de contagem de bacteriófagos em queijo por placas de lise e por microgotas apresentam comportamentos semelhantes, concluindo que a escolha da técnica não interfere na contagem dos bacteriófagos.

Portanto os bacteriófagos líticos de *L. monocytogenes* isolados tem potencial para o biocontrole de populações *L. monocytogenes*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDON, S. T. **Bacteriophage Ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses**. Nova Iorque: Cambridge University Press, 508 p. 2008.

ALEGRO, M. R. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **UNOPAR Científica Ciência Biológica de Saúde**, v. 13(1), p. 59-67, 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington, 345p. 1992.

AMORIM, A.L.B.C. **Avaliação da qualidade higiênica e sanitária de queijos tipo Minas Padrão de fabricação industrial, artesanal e informal**. Universidade de Brasília. Monografia apresentada para a conclusão do curso de medicina veterinária da faculdade de agronomia e medicina veterinária. Brasília, 2013.

ANANY, H., CHEN, W., PELTON, R., GRIFFITHS, M.W. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6379-6387, 2011.

ANDRADE, L.A.F. **Bacteriófagos e sua aplicabilidade no controle de populações microbianas**. Dissertação (Especialista em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

ANDRADE, R.R, SILVA, P.H.C., SOUZA, N.R., MURATA, L.S., GONÇALVES, V.S.P., SANTANA, A.P. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 147-152, 2014.

BISNETO, J.P.G. **Listeria monocytogenes: um perigo presente nos alimentos**. Trabalho de conclusão em medicina veterinária. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

BILLE, J, ROCOURT, J. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., PFALLER, M.A., YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 8<sup>th</sup> Ed. Washington: ASM, 2003, v. 1, Cap. 33, p. 461-471.

BISNETO, J.P.G. **Listeria monocytogenes: Um Perigo Presente nos Alimentos**. 2012. 7p. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul Faculdade de Veterinária. Trabalho de Conclusão em Medicina Veterinária. Porto Alegre, 2012.

BRANDÃO, M.L.L., COSTA, J.C.B., FARIAS, F.M., ROSAS, C.O., BRICIO, S.M.L., NASCIMENTO, J.S., LEITE, P.C. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo *Listeria monocytogenes* em matriz queijo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1905-1910, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº352/1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 04 set. 1997. Seção 1, p. 19684.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 91/93 do Grupo Mercado Comum aprova o Regulamento Técnico MERCOSUL para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 de dezembro de 1996<sup>a</sup>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE - **Produção da Pecuária Municipal**, ISSN 0101-4234.V.39, 2011.

BRITO, J. R. F. Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 15, p. 4954-4961, 2008.

Carrillo, C. L., Atterbury, R. J., El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Scott A., Connerton I. F. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 71, n.11, p. 6554–6563.10.1128, 2005.

CARLTON, R.M., NOORDMAN, W.H., BISWAS, B., DE MEESTER, E.D., LOESSNER, M. J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral

toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 301-312, 2005.

CHIBEU, A., AGIUS, L., GAO, A., SABOUR, P.M., KROPINSKI, A.M., BALAMURUGAN, S. Efficacy of bacteriophage LISTEXT<sup>TM</sup>P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 208-214, 2013.

CHING, J., MUSHEYEV, S.A., CHOWDHURY, D., KIM, J., CHOI, Y., DENNEHY, J.J. Migration enhances adaptation in bacteriophage populations evolving in ecological sinks. **Evolution**, v. p.22, 2012.

CORTEZ, N.M.S, CALIXTO, F.A.A., DE CAMPOS, O.F., ZOCCAL, R., FRANCO, R.M., CORTEZ, M.A.S. Avaliação da produção e da qualidade bacteriológica e detecção de bacteriófagos e de antimicrobianos em soro de queijo produzido no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 166-171, 2013.

DAIRY. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **PSD: production, supply and distribution**. Reports. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture - USDA, 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: jun. 2014.

DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 59, n. 6, p. 183-194, 2001.

FDA- US DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Food Safety and Inspection Service. Pathogen reduction: hazard analysis and critical point

(HACCP) systems final rules. **Federal Register**, Washington, v. 61, p. 38940-38941, 1996.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994.112p.(Manual técnico para produção industrial de queijos).

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos**: causas e prevenção. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 2005. 200p.

GARCIA, P, et al, Bacteriophages and their application in food safety. **The society for applied microbiology, letters in applied microbiology**, n. 47, p. 479, 2008.

GARCÍA, P., RODRÍGUEZ, L., RODRÍGUEZ, A., MARTÍNEZ, B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in food science e technology**, v. 21, p. 373-382, 2010.

GOMES, J.P., PRUDENCIO, S.H., SILVA, R.S.S.F. Queijo tipo Minas Frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30(Supl.1): 77-85, maio 2010.

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**, v. 75, n. 1, p. 93-100, 2009.

GRIPON, J.C., DESMAZEAUD, M.J., LE BARDS, D., BERGÈRE, J.L. Etude du role des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. **Le Lait**, Paris, v. 55, n. 548, p. 502-512, 1975.

HAGENS, S.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 1, 2010.

HUNGARO, H.M, R. C. S. MENDONÇA, D. M. GOUVÊA, M. C. D. VANETTI, C. L. de O. PINTO. Use of bacteriophages to reduce Salmonella in chicken skin in comparison with chemical agents. **Food Research International**, v. 52, p. 75-81, 2013.

HUNGARO, H.M. **Biocontrole de Salmonela enterica em pele de frango de corte**. 2010.73p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores - Estatística da Produção Pecuária. Junho de 2014. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201401\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201401_publ_completa.pdf)

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. ASPEN Publishers, Gaithersburg, MD., 854p, 2005.

KIRINUS, J. K. KREWER, C., ZENI, D., MONEGO, F., SILVA, M.C., KOMMERS, G.D., VARGAS, A.C. Surto de listeriose sistêmica em chinchilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 686-689, 2010.

KLUMPP, J.; LOESSNER, J. M.; Listeria phages Genomes, evolution, and application. **Bacteriophage** 3:3, e26861; September 2013.

KUTTER, E., SULAKVELIDZE, A. Bacteriophages: biology and applications. **CRC Press**, United States of America, 2005. 510p.

MARTINS, E.A. **Listeria monocytogenes em produtos fatiados do tipo ready-to-eat, presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo: ocorrência, quantificação e sorotipagem.** Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

MARTINS, S.C.S.G., ROCHA J.R.V.R., CALDEIRA, L.A., REIS, S.T., BARROS, I.C., OLIVEIRA, J.A., SANTOS, J.F., SILVA, G.W.V. Rendimento, composição e análise sensorial do queijo minas frescal fabricado com leite de vacas mestiças alimentadas com diferentes volumosos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n.4, p.994, 2012.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, PARKER, J.M. Brock Biology of Microorganisms. 14<sup>a</sup>. Pearson Education. 245-257p. 2015.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A., CUROTTO, S. M. R., BAPTISTA, A. A. S., DONATO, T. C., TAKAHIRA, R. K., SEQUEIRA, J. L., ANDREATTI FILHO, R. L. Effects of Lactobacillus Probiotic, P22 Bacteriophage and Salmonella Typhimurium on the Heterophilic Burst Activity of Broiler Chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**. Botucatu, São Paulo, Brazil, 2014.

MILOHANIC, E., JONQUIERES, R., GLASSER, P., DEHOUS, P., JACQUET, C., BERCHE, P., COSSART, P., BAILLARD, J.L. Sequence and binding activity of the autolysin-adhesin ami from epidemic *Listeria monocytogenes* 4b. **Infection Immunity**, v. 72, n. 8, p. 4401-4409, 2004.

MONTEIRO, L.R.L., MESQUITA, A.J., ANDRÉ, M.C.D.P.B., CARDOSO, J.L. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from animal products in a city of Northern Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.8, p.1443-1448, 2013.

NES, F.D. **Caracterização molecular e susceptibilidade antimicrobiana de linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos lácteos do RS.** Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

OLIVEIRA, M. M., BRUGNERA, D.F., ALVES, E., PICCOLI, R.P. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 97-106, 2010.

OLIVEIRA, M., VIÑAS, I., COLÀS, P., ANGUERA, M., USALL, J., ABADIAS, M. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. **Food Microbiology**. v. 38, p. 137-142, 2014.

O'FLAHERTY, S. Bacteriophage and their lysins fore limination of infectious bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 33, p. 801–819, 2009.

PEREIRA, D.B.C., SILVA, P.H.F., JUNIOR, L.C.G., OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados: Métodos analíticos.** 2ª ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 234 p. 2001.

PERRY, K.S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIETA, L. **Investigação da Presença de *Listeria* Spp. e *Listeria Monocytogenes* em Equipamentos e Utensílios de Indústrias de Laticínios.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos, para obtenção do Título de Engenheira de Alimentos. Porto Alegre, 2010.

PINTO, M.S., FORTES, C. L.; FERREIRA, DE L.; MARTINS J. M.; TEODORO, V. A. M., PIRES, A. C. S., FONTES, L. B. A.; VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo Minas Artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas praticas de fabricação. **Pesquisa agropecuária tropical**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 342-347, 2009.

RAKHUBA, D V; KOLOMIETS, E I; SZWAJECER DEY, E; and NOVIK, G I. Bacteriophage Receptor, Mechanism of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. **Pol J Microbiol**. 2010; 59 (3):145-55. PMID: 21033576 [PubMed - indexed for MEDLINE]

RICARDO, N. R., KATSUDA, M. S., MAIA, L. F., ABRANTES, L. F., OSHIRO, L. M. Análise Físico-Química de Queijos Minas Frescal Artesanais e Industrializados Comercializados Em Londrina-PR. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão (PR), v. 2, n. 2, p. 89-95, 2011.

ROSSI, L. P.R., ALMEIDA, R. C.C., LOPES, L. S., FIGUEIREDO, A. C.L., RAMOS, M. P.P., ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian 26 fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. **Food Control**, Guildford, v. 22, p. 954-958, 2011.

ROSSI, L.P.R., ALMEIDA, R.C.C., Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 151-160, 2010.

RUWER, C.M., MOURA,J.F., GONÇALVES, M.J.F. Surto de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, AM (2005-2009): O problema do

queijo coalho. **Revista de segurança alimentar e nutricional**, v. 18, n. 2, p. 60-66, 2011.

SILLANKORVA S, NEUBAUER P, AZEREDO J (2010) Phage control of dual species biofilmes of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. **Biofouling** 26:567-575.

SILVA, Á.S., ARAGON C.C., SANTANAE, H.W., DESTRO, M.T., SILVA, E.N.G.C. **Eficácia do Bacteriófago P100 e Sais de Ácidos Orgânicos no Controle da Contaminação por *Listeria monocytogenes* Inoculada Artificialmente em Queijos**. 2011.16p. (Mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2011.

SILVA, T. V., SANTOS. M., TAKAKI, A.M., MIMURA, H.J., ALVAREZ, D.C. **Caracterização Físico-Química de Queijos Tipo Minas Frescal Produzidos por Pequenos Produtores do Município de Guarapuava e Região**. **In: São de Extensão e Cultura**. ISBN 978-85-7891-008-2, 2008.

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

SONI, K.A., DESAI, M., OLADUNJOYE, A., SKROBOT, F., NANNAPANENI, R. **Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials**. **International journal of food microbiology**, v. 155, p. 82-88, 2012.

SONI, K.A., NANNAPANENI, R., 2010a. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. **Journal of food protection**, v. 73, p. 32-38, 2010.

SONI, K.A., NANNAPANENI, R., 2010b. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. **Journal of food protection**, v. 73, p.1519–1524, 2010.

SOUSA, A. M. **Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas**. 2012, 41p. Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

SULAKVELIDZE, A., BARROW, P. Phagetherapy in animals and agribusiness. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: Biology and Applications**, Boca Raton: CRC Press, p. 335-380, 2005.

USFDA, 2006. **Agency response letter GRAS notice no. GRN 000198**. Disponível:<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154675.htm> (last accessed on March 16, 2014).

USFDA, **Agency response letter GRAS notice no. GRN 000218.2007**. Disponível:<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153865.htm> (last accessed on March 16, 2014).

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., GONZÁLEZ-ZORN, B., KREFT, E., GOEBEL, W. Pathogenicity Islands and Virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection.**, v. 3, p. 571-584, 2001.

VINHA, M.B., PINTO, C.L.O., SOUZA, M.R.M., CHAVES, J.B.P. **Fatores socioeconômicos da produção de queijo Minas Frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG.** *Ciência Rural* vol.40 n° 9. Santa Maria. Setembro, 2010.

YAMAGUCHI, M. U., ZANQUETA, É. B., MOARAI, J. F., FRAUSTO, H. S. E. G., SILVÉRIO, K.I. Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: pesquisa de Salmonella E Listeria. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 6, n.3, p. 417-434, 2013.

ZAFFARI, C.B., MELLO, J.F., COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.