

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ANGÉLICA AGOSTINHO MACHALELA

USO DE BACTERIÓFAGOS COMO ALTERNATIVA DE CONSERVAÇÃO DE LEITE
EM MOÇAMBIQUE

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

ANGÉLICA AGOSTINHO MACHALELA

**USO DE BACTERÍOFAGOS COMO ALTERNATIVA DE CONSERVAÇÃO DE
LEITE EM MOÇAMBIQUE**

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
2016

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

T

M149u
2016 Machalela, Angélica Agostinho, 1989-
Uso de bacteriófagos como alternativa de conservação de
leite em Moçambique / Angélica Agostinho Machalela. –
Viçosa, MG, 2016.
xii, 66f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Leite - Bacteriologia - Moçambique. 2. Bacteriófagos.
3. *Pseudomonas fluorescens*. 4. Leite - Conservação.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

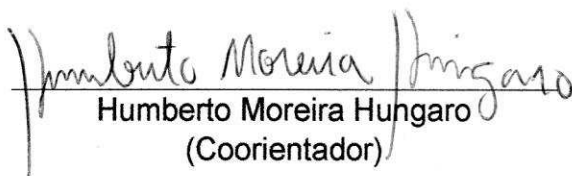
CDD 22. ed. 664.07679

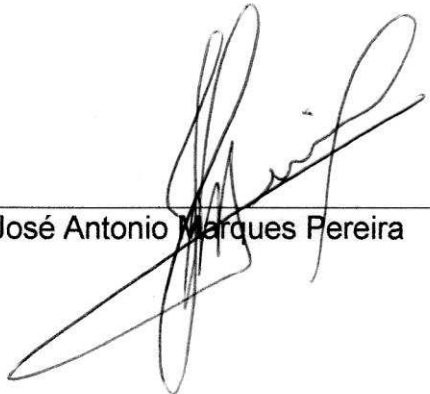
ANGÉLICA AGOSTINHO MACHALELA

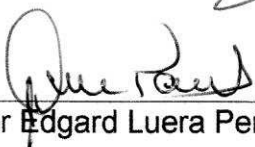
**USO DE BACTERIÓFAGOS COMO ALTERNATIVA DE CONSERVAÇÃO DE
LEITE EM MOÇAMBIQUE**

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*.

APROVADA: 29 de julho de 2016


Humberto Moreira Hungaro
(Coorientador)


José Antonio Marques Pereira


Wilmer Edgard Luera Peña


Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

*Á Deus, minha filha, meu marido
meus pais, meus irmãos, aos demais
familiares e
aos meus amigos
pelo apoio, amor e compreensão.*

DEDICO

*"A educação e o ensino são as mais poderosas
armas que podes usar para mudar o mundo. Depois de termos
conseguido subir a uma grande montanha, só descobrimos que
existem ainda mais grandes montanhas para subir".*

(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, fé e nunca me deixar sozinha nas horas mais difíceis;
À minha família que se dedicou intensamente para que eu chegasse até aqui,
pelo imenso apoio nas horas mais difíceis fazendo-se presente e tornando a
caminhada mais tranquila.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização
deste curso.

Ao Instituto Superior Politécnico de Gaza (ISPG) pela concessão da
bolsa de estudo e a NICHE pelo apoio financeiro.

À professora Regina Célia Santos Mendonça pela amizade, força,
carinho, confiança, orientação, oportunidade, atenção e apoio em todos os
momentos deste curso.

Aos professores Humberto Hungaro, Ítalo Perone, Monique Eller e
Wilmer Edgard pelas contribuições e sugestões.

Aos professores Antônio Fernandes e Edimar Aparecida pela concessão
do laboratório e equipamentos para realização de algumas análises.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia
de Alimentos, pelos conhecimentos e atenção dada.

Aos funcionários do Laticínios Viçosa, pelo apoio na realização de
algumas análises. Aos colegas Elizabeth Pires e Maura, pela ajuda na
execução e realização de algumas análises do experimento.

À grande família do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de
Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), Maryoris, Laís, Luiz, Delaine, Nayara,
Sergio, Rodrigo, Luana, Alejandro, Isabel, Tainah, Arthur, Letícia Cupertino,
Nélio, Marco Túlio, Lorena, Angélica, Lucas, Daniela e Letícia Cruz pelo
carinho, apoio, força e por terem proporcionado dias de muita alegria. Em
especial para Laís por se tornar uma grande amiga, irmã e companheira em
muitos momentos partilhando a sua família comigo. A Maryoris e a Loyde pela

ajuda e conselhos de irmãs mais velhas que me fizeram crescer cientificamente e espiritualmente.

À toda comunidade Africana presente em Viçosa pelo apoio, carinho e acolhimento.

À minha princesa Anne Priscila pelo carinho, amor e compreensão. Aos meus pais, Agostinho Machalela e Celeste Matola pelo amor incondicional, educação, viii respeito, confiança, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos irmãos, Fernando, Nelson e Armando, pelo carinho, amizade e companheirismo em todos os momentos. Ao meu amor, Rafil Esmail pelo companheirismo, incentivo e carinho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação, meus sinceros agradecimentos,

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Angélica Agostinho Machalela, filha de Agostinho Machalela e Celeste Cacilda Matola Machalela, nasceu em Moçambique, Província de Sofala, no dia 02 de Março de 1989.

Em Dezembro de 2011 graduou-se em Engenharia Zootécnica pelo Instituto Superior e Politécnico de Gaza, em Chókwe, Província de Gaza.

Em Março de 2014, ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
1.2.1 Composição do leite	4
1.2.2 Aspectos nutricionais	6
1.2.2.1 Lactose	6
1.2.2.2 Sais	6
1.2.2.3 Lipídeos	7
1.2.2.4 Proteínas	8
1.2.3. Qualidade microbiológica do leite	8
1.2.3.1. <i>Pseudomonas</i> spp	11
1.2.4. Outros grupos bacterianos	12
1.2.5 Fontes de contaminação do leite	12
1.2.5.1 Vacas saudáveis	13
1.2.5.2 Vacas insalubres	13
1.2.6 Contaminação durante e após a ordenha	13
1.4. Uso de bacteriófagos no biocontrole de bactérias patogênicas	18
CAPÍTULO 2	28
2.2.1. Micro-organismos	30
2.2.2. Isolamento e purificação dos bacteriófagos	30
2.2.3. Propagação dos bacteriófagos	31
2.2.4. Titulação e contagem dos bacteriófagos na suspensão	31
2.2.5. Avaliação da gama de hospedeiros dos bacteriófagos	32
2.2.6. Diversidade genética entre os isolados pelo perfil de polimorfismo ...	32
2.2.7. Cinética de adsorção do bacteriófago	34
2.2.8. Características de crescimento dos bacteriófagos	34
2.2.9. Fatores que afetam os bacteriófagos	35
2.2.9.1. Viabilidade dos bacteriófagos à luz UV e fluorescente	35
2.2.9.2 Viabilidade dos bacteriófagos a acidez	36

2.2.9.3. Viabilidade dos bacteriófagos em soluções sanitizantes e de limpeza na indústria de alimentos.	36
2.2.9.4. Viabilidade dos bacteriófagos á salinidade e íons	37
2.2.9.5. Viabilidade dos bacteriófagos á temperatura	37
2.3.1 Isolamento e purificação de bacteriófagos	37
2.3.2. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados	38
2.3.3 Ensaio de restrição.....	39
2.3.4. Cinética de adsorção do fago	40
2.3.5 Características de crescimento dos bacteriófagos	42
2.3.6. Viabilidade dos bacteriófagos á luz, ácidos orgânicos, temperatura e soluções sanitizantes.	43
CAPITULO 3.	50
3.2.1. Avaliação do biocontrole	52
3.2.2. Contagem de bactérias lácticas (BAL) e <i>P. fluorescens</i>	52
3.2.3. Análises físico-químicas no leite	53
3.2.4. Análise da proteólise	53
3.2.5. Delineamento experimental	54
3.3.1. Contagem de <i>P. fluorescens</i> e BAL nos tratamentos	55
3.3.2. Análises físico-químicas no leite	60
3.3.3. Análise da proteólise	62
4. CONCLUSÃO GERAL	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Placas de lise dos bacteriófagos isolados em cultura de <i>P. fluorescens</i> plaqueada sobre a superfície de ágar sobrecamada (TSA).	38
Figura 2.2. Restrição do comprimento do fragmento de polimorfismo (RFLP) da UFV-HQ, UFV- HD, UFV-HR, UFV-SG, UFV-HT e UFV- H.....	39
Figura 2.3. Curva de adsorção dos bacteriófagos UFV-SG, UFV-HD, UFV-HQ após contato com o hospedeiro <i>P. fluorescens</i>	41
Figura 2.4. Logaritmo de unidades formadoras de placas de lise durante “one-step growth” dos bacteriófagos UFV-SG, UFV-HQ e UFV-HD para <i>P. fluorescens</i>	43
Figura 3.1. Análise da proteólise no leite pasteurizado tratado e armazenado a 4 °C, durante nove dias, sendo: BSA (albumina de soro bovino), LC- (leite), CB ⁺ (leite + inóculo), CF (leite + bacteriófago), F10 ⁶ (leite + inóculo + bacteriófago) e F10 ⁸ (leite + inóculo + bacteriófago).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Evolução da produção e consumo anual de leite.....	3
Tabela 1.2. Composição aproximada do leite da vaca	5
Tabela 1.3. Métodos de conservação do leite	16
Tabela 2.1. Concentração das soluções sanitizantes testadas e o tempo de contato com os bacteriófagos.	37
Tabela 2.2. Fagos de <i>P. fluorescente</i> livres em função do tempo de adsorção.....	40
Tabela 2.3. Resistência dos bacteriófagos a fatores comuns na indústria de alimentos.	44
Tabela 2.5. Perda de viabilidade do bacteriófago (Log PFU·mL ⁻¹) após exposição a diferentes condições (congelamento, refrigeração e pasteurização).	45
Tabela 3.1. Esquema empregado no estudo para avaliar a efetividade do uso dos bacteriófagos em leite	52
Tabela 3.2. Média das contagens de <i>P. fluorescens</i> no leite cru armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 2 e 3) dias.	55
Tabela 3.3. Média das contagens diárias de BAL no leite cru armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 2 e 3) dias.	57
Tabela 3.4. Média das contagens de <i>P. fluorescens</i> no leite pasteurizado armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 3, 6 e 9) dias.....	58
Tabela 3.5. Média das contagens diárias de BAL no leite pasteurizado armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 2 e 3) dias.	59
Tabela 3.7. Características físico-químicas do leite cru estocado a (4 e 15)°C durante o armazenamento.	61

RESUMO

MACHALELA, Angélica Agostinho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Uso de bacteriófagos como alternativa de conservação de leite em Moçambique.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Ítalo Tuler Perone e Humberto Moreira Hungaro.

A proteólise do leite causada principalmente por *P. fluorescens*, é um problema importante na indústria de laticínios por causa da deterioração do leite cru e pasteurizado refrigerado durante o armazenamento. O presente estudo descreve o isolamento, a caracterização de bacteriófagos para *P. fluorescens* (NCTC 10038) e o biocontrole de *P. fluorescens* no leite cru e pasteurizado armazenado a 4, 15 e 24 °C. Os bacteriófagos foram isolados de amostras de água residuária de vários setores de uma indústria de laticínio. Foram isolados seis bacteriófagos, dos quais três (UFV-SG, UFV-HD e UFV-HQ) foram testados contra algumas condições encontradas na indústria de alimentos e produtos antimicrobianos, pois, todos apresentaram mesmo perfil pormifórmico. Determinaram-se também os parâmetros cinéticos de crescimento destes bacteriófagos. Os bacteriófagos estudados atingiram concentrações em torno de 10^9 UFP · mL⁻¹, apresentando uma taxa de absorção aproximada de $1,83 \times 10^{-9}$ mL.min⁻¹ a cada infecção da célula bacteriana foram liberados aproximadamente 200 bacteriófagos por ciclo. Estes bacteriófagos foram sensíveis à luz UV, pasteurização lenta, álcool 70, álcool gel, ácido peracético; desincrustante ácido para inox e o detergente alcalino para lavagem CIP, mas foram resistentes a várias condições, tais como sanitizantes dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio, pasteurização rápida, sais e ácidos, mostrando potencial para utilização na indústria alimentar. Os resultados deste estudo sugerem que o bacteriófago é uma alternativa para o biocontrole de *P.fluorescens* no leite quando aplicado em concentrações elevadas e armazenado a baixas temperaturas. Foram identificados alguns detergentes e sanitizantes que podem ser utilizados na descontaminação de superfícies e equipamentos contaminados por bacteriófagos que afetem a produção na indústria de laticínios.

ABSTRACT

MACHALELA, Angélica Agostinho, M.Sc., Federal University of Viçosa, July, 2016. **Use of bacteriophages as milk conservation alternative in Mozambique.** Advisor: Regina Celia Santos Mendonça. Co-Advisors: Ítalo Tuler Perone and Humberto Moreira Hungaro.

The proteolysis of milk mainly caused by *P. fluorescens*, is a major problem in the dairy industry because of the deteriorating raw milk pasteurized and refrigerated during storage. The present study describes the isolation and characterization of bacteriophages for *P. fluorescens* (NCTC 10038) and *P. fluorescens* biocontrol in raw and pasteurized milk stored at 4, 15 and 24 ° C. Bacteriophages were isolated from wastewater samples from various sectors of the dairy industry. six bacteriophages were isolated, of which three (UFV-SG, UFV-HD and UFV-HQ) were tested against some conditions found in the food industry and antimicrobial products, because all had the same profile. It also determined the kinetic parameters of growth of these bacteriophages. Bacteriophage concentrations studied reached around 10^9 PFU·mL⁻¹ having an approximate rate of absorption of 1.83×10^{-9} ml min⁻¹ for each infection of bacterial cells were released approximately 200 phage per cycle. These bacteriophage were sensitive to UV light, pasteurization, alcohol 70, alcohol gel, peracetic acid; descaling stainless and acid to the alkaline CIP detergent for washing, but were resistant to various conditions, such as sodium dichloroisocyanurate of sanitizers, hydrogen peroxide, quick pasteurization, salts and acids, showing potential for use in the food industry. The results of this study suggest that the bacteriophage is an alternative for the biocontrol of *P. fluorescens* in milk when applied in high concentrations and stored at low temperatures. They identified some detergents and sanitizers which may be used to decontaminate surfaces contaminated with bacteriophages and equipment that affect the production in the dairy industry.

INTRODUÇÃO GERAL

O leite é um alimento completo do ponto de vista nutricional devido à sua composição química sendo amplamente consumido em todo o mundo. Por isso é importante que a microbiota do leite seja conhecida e controlada, uma vez que diversos micro-organismos deterioradores e/ou patogênicos aos seres humanos podem ser veiculados pelo leite de baixa qualidade. Neste sentido, os métodos de conservação do leite são fundamentais para diminuir ou eliminar estes micro-organismos, proporcionando uma melhor qualidade nutricional ao produto, maior vida de prateleira e maior segurança alimentar aos consumidores (REZER, 2010).

Na África, a agricultura desempenha um papel preponderante na economia, seja como fonte de emprego da maioria da sua população, ou como fonte de receitas do governo através de exportação de produtos agrários. Em Moçambique, a agricultura emprega mais de 80 % da população (INE, 2014). No seguimento de lácteos, devido à escassez de fábricas de processamento de leite, Moçambique gasta em média cerca de USD 200 milhões anualmente na importação de derivados lácteos, segundo dados da Cooperativa dos Produtores de Leite (Copoleite), sediada em Beira, província de Sofala. A indústria moçambicana de laticínios registou um crescimento de 3,5 % durante o ano de 2014, situação que foi melhorada com ajuda do governo dos Estados Unidos da América (EUA) que apoia o setor empresarial privado nacional, tanto na produção de leite como na montagem da infraestrutura de processamento do produto, no centro e norte de Moçambique (INE, 2014). O apoio do governo americano tem por objetivo melhorar a qualidade do leite produzido no país e aumentar a sua colocação no mercado doméstico formal. De acordo com a Land O'Lakes, uma cooperativa agrícola americana, o programa tem por objetivo a construção de centros de captação do produto e apoiar a elaboração de planos de negócio na área de laticínios para mais de mil pequenas e médias empresas moçambicanas espalhadas pelo país (INE, 2014).

A Copoleite estima que cada produtor nacional, desperdiça cerca de trinta mil litros de leite anualmente em decorrência de condições de armazenamento inadequadas (INE, 2014).

Bacteriófagos (ou fagos) possuem características favoráveis para aplicação como biocontrole tais como: a capacidade de infectar espécies dentro de um gênero, ou exclusivamente espécies ou estirpes específicas sem, contudo afetar os micro-

organismos desejáveis ou interferir na microbiota endógena do trato gastrointestinal (STEVEN e LOESSNER, 2007).

O biocontrole usando bacteriófagos é um método promissor, apresentando vantagens em comparação a outros métodos tais como: a) os bacteriófagos são autolimitantes, ou seja, somente se replicam na presença da bactéria com a qual possuem afinidade, b) não atuam na seleção de micro-organismos resistentes, c) podem ser administrados em dose única, d) são de fácil uso, e) são seguros para seres humanos, plantas e animais, f) além de sua ubiquidade e diversidade. Além disso, os bacteriófagos não causam alergias e não alteram a estrutura, odor ou sabor dos alimentos (ATTERBURY et al., 2007; HAGENS e OFFERHAUS, 2008).

O presente estudo foi realizado para avaliar o potencial do uso de bacteriófagos na redução da deterioração do leite e assim, atuarem como uma alternativa para o biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* e consequentemente reduzir a contaminação e deterioração do leite produzido em Moçambique. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Isolar selecionar e caracterizar bacteriófagos para *P. fluorescens*;
- Estudar a cinética dos bacteriófagos;
- Avaliar os fatores que afetam os bacteriófagos;
- Avaliar as características físico-químicas do leite adicionado de bacteriófagos;
- Avaliar a ação dos bacteriófagos sobre *P. fluorescens* adicionados ao leite em diferentes condições de armazenamento.

Esta dissertação é composta por três capítulos: O capítulo 1 fornece uma revisão sobre o leite, micro-organismos psicrótrópicos, a vida de prateleira do leite, aplicações dos fagos em alimentos e fatores que afetam os mesmos. Em seguida, no capítulo 2 é abordado o isolamento e caracterização dos fagos para *P. fluorescens* e no capítulo 3 é abordado o estudo sobre a capacidade de fagos para controlar *P. fluorescens* no leite. Por último são apresentadas as conclusões do estudo realizado.

CAPÍTULO 1

1.1 Produção de leite e derivados em Moçambique

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a produção de leite em Moçambique tem aumentado nos últimos quatro anos. Este aumento é devido a parceria entre o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) e a Land O'Lakes International Development que contribuíram para reavivar a tradição pecuária leiteira em Moçambique e incrementaram os rendimentos mensais dos pequenos agricultores em Moçambique em 225 %, em média. A produção e consumo de leite em Moçambique decresceram após a independência do país, conforme pode ser visualizado na Tabela 1, em virtude da desestabilização econômica decorrente da guerra civil contra o colonialismo Português.

Tabela 1.1. Evolução da produção e consumo anual de leite

Designação	Ano				Taxa de crescimento anual	
	1980	1990	2000	2002	1980-1990	1990-2002
Produção	71,5	71,7	68,6	68,8	0	- 0,4
Consumo	67,9	68,3	75,5	71,3	0,1	1,0

Fonte: FAO (2005a)

Por meio da ajuda internacional, começou a se reconstruir o rebanho leiteiro e criar uma cadeia produtiva de leite com maior valor agregado e sustentável na província de Manica. A província tinha sido historicamente uma das melhores áreas de Moçambique para a pecuária devido ao seu clima e localização estratégica que lhe favorecia o acesso a vários mercados. No entanto, o rebanho leiteiro na província bem como no resto do país diminuiu drasticamente durante a guerra dos 15 anos em Moçambique. Como consequência direta deste fato Moçambique começou a importar 90 % de sua necessidade de produtos lácteos. Além disso, os agricultores substituíram a pecuária pela agricultura em pequena escala.

Quatro milhões de dólares aportado pela Land O'Lakes foi utilizado na aquisição de aproximadamente 400 vacas leiteiras e sua distribuição a 265 agricultores durante um período de três anos, desde 2009. O projeto da Land

O'Lakes também inclui o oferecimento de treinamento dos agricultores em técnicas de alimentação e preparo de forragens, manejo de pastagens, coleta de leite e marketing e criação animal. O projeto procura, além disso, mostrar aos agricultores como aumentar a produtividade usando o gado como ferramenta auxiliar para cultivar. Também foram criados três de coleta, processamento e distribuição de leite; e ajudou a estabelecer 11 associações leiteiras e três cooperativas leiteiras na região (USDA, 2012).

Os resultados são bastante significativos para o país. Os agricultores que ganhavam uma média de US\$ 37/mês passaram a ganhar em média de US\$ 106/mês após o início do programa. Os produtores de leite mais bem sucedidos têm triplicado seu lucro líquido, ganhando em média US\$ 190/mês. A produção de leite aumentou de zero para uma média de 32.000 L/mês ou aproximadamente 11 L de leite/animal. Os animais também contribuíram para melhorar a lucratividade de pequenos agricultores, pois, estes ao utilizarem o gado como ferramenta no auxílio do cultivo puderam aumentar a produtividade agrícola em cerca de 7 %. O número de pessoas que direta ou indiretamente foram beneficiadas por este projeto totalizava cerca de 347.000 em dezembro de 2011.

1.2 Leite

Leite é um fluido segregado pela glândula mamária de fêmeas de todas as espécies de mamíferos, das quais existem mais de 4000, com função primária de satisfazer os requisitos nutricionais completos do recém-nascido. A maioria das funções não nutricionais do leite é complementada por proteínas e peptídeos que incluem imunoglobulinas, enzimas e inibidores de enzimas, proteínas transportadoras ou de ligação, fatores de crescimento e agentes antibacterianos (Fox et al., 2015).

1.2.1 Composição do leite

A composição do leite é determinante para o estabelecimento da sua qualidade nutricional, adequação para processamento e consumo humano. A composição aproximada do leite de vaca é apresentada na Tabela 2.

Tabela 1.2. Composição aproximada do leite da vaca

Componentes	Teor médio (g/kg)	Variação (g/kg)	Teor médio na matéria seca
Água	87,1	85,3 - 88,7	-
Extrato seco desengordurado	8,9	7,9 - 10,0	-
Lactose	4,6	3,8 - 5,3	36
Gordura	4,0	2,55 - 5,5	31
Proteína	3,3	2,3 - 4,4	25
Caseína	2,6	1,7 - 3,5	20
Minerais	0,7	0,57 - 0,83	5,4
Ácidos orgânicos	0,17	0,12 - 0,21	1,3
Diversos	0,15	-	1,2

Fonte: Walstra et al.,(2006) Adaptado

O açúcar do leite está sob a forma da lactose é um dissacarídeo composto por glicose e galactose, a lactose é um açúcar redutor.

A gordura é em grande parte composta de triglicerídeos, constituindo uma mistura complexa. Os componentes dos ácidos gordos variam muito no comprimento de cadeia (2 a 20 átomos de carbono) e na saturação (de 0 a 4 ligações duplas). Outros lipídeos que estão presentes são os fosfolipídeos, colesterol, ácidos gordos livres, monoglicérides, diglicérides.

Cerca de quatro quintos da proteína do leite é constituída pela caseína, a caseína é uma mistura de quatro proteínas: α S1-, α S2-, β -, e κ -caseína. O restante do leite é constituído, na sua maior parte por proteínas séricas, sendo a principal delas β -lactoglobulina.

Os minerais presentes no leite, principalmente K, Na, Ca, Mg, Cl e fosfato. O leite contém vários outros elementos em quantidades vestigiais, por exemplo, os ácidos orgânicos que ocorrem em grande parte como iões, ou como sais; citrato é o principal sal do leite.

1.2.2 Aspectos nutricionais

1.2.2.1 Lactose

A lactose fornece energia (cerca de 17 kJ/ g), principalmente ao animal jovem mas tem outras funções, tais como dar um sabor adocicado ao produto. A lactose não pode ser absorvida diretamente para a corrente sanguínea; ela deve ser primeiro hidrolisada em glicose e galactose. Isto ocorre lentamente, o que evita um aumento súbito dos níveis de glicose no sangue após a ingestão de uma quantidade substancial de leite (WALSTRA et al.,2006).

A lactose é hidrolisada pela enzima lactase, mais precisamente, β -galactosidase, que é segregada no intestino delgado. Durante a amamentação há necessidade da presença desta enzima, e com o passar dos anos a quantidade de enzima produzida pelo corpo humano diminui consideravelmente. Em alguns indivíduos a atividade da enzima é drasticamente reduzida (5 a 10 % da quantidade inicialmente produzida pelo corpo), e sendo assim, metabolizam mal a lactose. Tais indivíduos são chamados de intolerantes a lactose. O consumo de leite aumenta consideravelmente a atividade da flora do cólon. Cerca de metade dos intolerantes a lactose, desenvolvem problemas, que vão desde a flatulência a diarreia grave. Tem sido frequentemente observado que produtos lácteos fermentados quase não produzem intolerância à lactose, embora ainda contenham cerca de dois terços da lactose original; a explicação não é totalmente clara (WALSTRA et al.,2006).

1.2.2.2 Sais

Um nutriente muito importante no leite é o fosfato de cálcio, que é necessário para o crescimento e manutenção dos ossos. Por conseguinte, os fosfatos de cálcio são pouco solúveis em água, o que os torna difíceis de perceber em concentrações elevadas num sistema aquoso como o leite (WALSTRA et al.,2006).

Ruminantes, como a vaca, tem alguns mecanismos para superar este problema. Em primeiro lugar, o leite de vaca tem um teor relativamente elevado de caseína, a caseína pode conter grandes quantidades de fosfato de cálcio não dissolvidas durante a formação de micelas de caseína. Em segundo lugar, a concentração de citrato no leite é alta, e se associa fortemente com o cálcio, o que significa que a atividade do íon cálcio em leite é muito baixa; Em terceiro lugar, parte

do fosfato é esterificados e assim, mantidos nas micelas de caseína ou em solução (WALSTRA et al.,2006).

Leite e produtos lácteos constituem uma importante fonte de cálcio para os seres humanos; o cálcio destes produtos é bem absorvido. Além disso, a relação molar de Ca/P (incluindo fosfato orgânico) é igual a 0,9 no leite; o que é uma proporção bastante elevada em comparação com a maioria dos alimentos. Tal fato o coloca como um alimento benéfico para pessoas que são propensas a sofrer de osteoporose (perda de massa óssea). A maior parte do cálcio ingerido não é absorvido, permanecendo no intestino como fosfato de cálcio amorfo sobre o qual vários compostos solúveis podem adsorver o que resulta em alguns efeitos benéficos, tais como: Diminui o risco de cancro do cólon em ratos e, provavelmente, também nos seres humanos. O leite é uma boa fonte de outros minerais, incluindo os oligoelementos, especialmente zinco. Alguns oligoelementos são tóxicos (por exemplo, Cd, Hg e Pb), mas eles quase nunca são detectados no leite em concentrações inseguras (WALSTRA et al.,2006).

1.2.2.3 Lipídeos

A gordura no leite fornece principalmente energia, cerca de 37 kJ.g⁻¹. A gordura do leite é bem digerível, independentemente da forma física (glóbulos de gordura naturais ou homogeneizados, ou manteiga). No entanto, os ácidos graxos saturados de cadeia longa, especialmente o ácido esteárico, liberados no intestino, não pode ser completamente absorvido na presença de cálcio, porque o estearato de cálcio é pouco solúvel em pH neutro. A gordura do leite tem outras funções, é solvente para algumas vitaminas (A, D e E). Outras funções da gordura provêm de nutrientes linoleicos e ácidos linolênicos, muitas vezes de ácidos gordos essenciais (EFA). Estes são precursores de alguns hormônios e outros metabolitos essenciais, que fornecem o baixo ponto de fusão dos resíduos de ácidos graxos de cadeia longa (WALSTRA et al.,2006)

A gordura do leite é muitas vezes considerada hipercolesterolêmica, isto é, provoca um aumento do nível de colesterol no sangue, devido ao seu alto teor de conteúdo de ácidos graxos saturados e baixo teor de poli-insaturados. Consequentemente, a ingestão de gordura do leite tem sido associada com o aumento da incidência de doenças cardíacas. Por outro lado, alguns cientistas

supõem que a presença de certos ácidos linoleicos conjugados (CLA) na gordura do leite pode proteger contra o câncer (WALSTRA et al.,2006).

1.2.2.4 Proteínas

As proteínas tem como papel nutricional primário o fornecimento de aminoácidos essenciais e ácidos: isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, lisina, triptofano e valina. Para este fim, a proteína deve ser de alta digestibilidade e conter uma quantidade suficiente destes aminoácidos. A digestibilidade da proteína do leite é de quase 100 %. O valor nutricional pode ser expresso de várias maneiras, uma destas maneiras é usando a razão de eficiência proteica (PER). O valor PER de caseína, da proteína do soro e da proteína global no leite integral é 2,5, 3,0 e 3,3 respectivamente, valores superiores do que a maioria dos alimentos proteicos. O valor nutricional da mistura de caseína e das proteínas de soro do leite é mais elevado do que o valor nutricional de cada uma separadamente, pois, elas são complementares na concentração de alguns aminoácidos essenciais: caseína é relativamente alta em Tyr e Phe, proteína de soro no Cys contendo enxofre e Met. A proteína do leite pode aumentar consideravelmente o PER de uma dieta composta de alimentos vegetais (WALSTRA et al.,2006).

Outra função nutricional de caseína é que ela pode ligar-se a grandes quantidades de nutrientes tais como cálcio e fosfato (WALSTRA et al.,2006).

Foram identificadas várias sequências de peptídeos bioativos em proteínas de leite, especialmente em caseína. Os peptídeos bem conhecidos são os caseinomorphins de β -caseína, que têm propriedades opióides, induzem o sono. Outros inibem a enzima conversora de angiotensina (ACE), reduzindo assim a pressão arterial. Ainda outros, contendo SERP, podem ajudar na adsorção de cátions divalentes no intestino delgado. Todas estas atividades foram estabelecidas em estudos in vitro, mas a evidência clínica para efeitos significativos nos seres humanos não foram estabelecidos (WALSTRA et al.,2006).

1.2.3. Qualidade microbiológica do leite

O leite é uma boa fonte de nutrientes, não só para os mamíferos, mas também para diversos micro-organismos que podem crescer no leite. Estes micro-

organismos são principalmente bactérias, mas alguns fungos e leveduras podem também crescer em leite. O leite contém vários nutrientes, que favorecem a fermentação e o crescimento de diversas espécies bacterianas. Dada a diversidade de micro-organismos que podem crescer no leite deve-se tomar cuidado na aplicação de regras gerais. Para algumas bactérias, a lactose não é uma fonte de energia adequada. Outros dependem de aminoácidos livres como fonte de nitrogênio e o leite fresco contém apenas pequenas quantidades de aminoácidos livres. Consequentemente, tais bactérias muitas vezes começam a crescer após outras bactérias terem hidrolisado as proteínas, fornecendo assim o aporte de nutrientes adequados. Outro exemplo é a produção de CO₂ por alguns estreptococos que estimula o crescimento de alguns lactobacilos, em contrapartida algumas bactérias gram-negativas são inibidas pelo CO₂ (WALSTRA et al.,2006).

O leite não oferece ótimas condições para o desenvolvimento de agentes patogênicos, ele simplesmente atua como um veículo de agentes patogênicos. Em muitos países, a condição higiênica do leite em relação a estes micro-organismos é satisfatória. No entanto, as infecções alimentares causadas pelo consumo de leite cru ocorrem especialmente em países tropicais e subtropicais, onde o risco de infecção pode ser maior (WALSTRA et al.,2006).

Geralmente, tomar leite cru é desaconselhável devido à presença de micro-organismos patogênicos associados ao leite, como é o caso de: *Escherichia coli*, é uma bactéria gram negativa, anaeróbia facultativa e fermenta a lactose. Algumas estirpes desta bactéria são enteropatogênicas e entre elas a *E. coli* bem conhecida é a O157: H7, que pode causar colite hemorrágica (WALSTRA et al.,2006).

Salmonella e *Shigella* também são agentes patogênicos e podem causar distúrbios intestinais. *Yersinia enterocolitica* é um membro psicrotrófico, pode causar infecção entérica com sintomas idênticos à apendicite. A pasteurização lenta é suficiente para eliminar as bactérias desta família. Entre as outras bactérias gram-negativas existem alguns agentes patogênicos conhecidos como: *Aeromonas hydrophila* é um patógeno oportunista encontrado em fezes de animais saudáveis. Esta bactéria é psicrotrófica e pode crescer em meios com 5 % de sal (WALSTRA et al.,2006).

Brucella abortus foi encontrada no leite e é um agente patogênico para o homem e animais. É o agente causador da brucelose (WALSTRA et al.,2006).

Campylobacter jejuni pertence à família de Spirillaceae e pode ocorrer no trato intestinal de muitos animais. É uma causa comum de gastroenterite, diarreia, dores abdominais e câibras. Em todos estes casos, o leite é geralmente contaminado com estas bactérias via contato com o esterco. *Campylobacter* não sobrevive no queijo, em parte devido ao baixo pH. Alguns surtos relatados envolvendo estas bactérias são devido ao consumo do leite cru (WALSTRA et al.,2006).

As bactérias gram-positivas formadoras de esporos pertencem à família das Bacillaceae. Os dois gêneros mais importantes são *Bacillus* e *Clostridium*. Seus esporos são resistentes ao calor e outros agentes destrutivos. *Bacillus cereus* é uma bactéria comum do solo que é frequentemente encontrada no leite. Algumas estirpes são psicrotróficas e podem crescer a 7 °C. É capaz de produzir enterotoxinas nos alimentos e causar envenenamento. No entanto, é necessário um grande número de UFC para que o leite torne-se impróprio. Alguns produtos lácteos ricos em amido representam um risco maior porque a deterioração é mais difícil de observar. O aquecimento em temperatura acima de 100 °C durante pelo menos 5 min mata os esporos de *B. cereus*, que pertencem a classe dos bacilos menos resistentes ao calor (WALSTRA et al.,2006).

Outro grupo microbiano de importância a ser considerados no leite são as bactérias lácticas. Estas bactérias produzem principalmente ácido láctico a partir de carboidratos como lactose. Elas incluem os gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*. *Lactococcus lactis* spp e *Lactococcus cremoris* crescem rapidamente no leite, especialmente acima de 20 °C. Assim, a maior parte do leite fica ácido se não for refrigerado, e pode ocorrer agregação de partículas de caseína. As bactérias lácticas mesófilas não resistem à temperatura de pasteurização rápida (72 °C/ 15 s). Pasteurização lenta não mata bactérias lácticas termofílicas produtoras de ácido, tais como *Streptococcus thermophilus*. Nos laticínios é feita a seleção cuidadosa de estirpes de bactérias lácticas e essas são cultivadas sob condições controladas para produção de derivados de leite fermentados, por exemplo: iogurte, queijo, e manteiga (WALSTRA et al.,2006).

No grupo de micro-organismos deterioradores estão presentes também os psicrotróficos. Ocorrem de forma generalizada, e incluem os generos *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, e *Alcaligenes* (WALSTRA et al.,2006).

Psicrotróficos crescem facilmente a baixas temperaturas (<15 °C); no leite eles proliferam mesmo a uma temperatura tão baixa quanto 4 °C. Apresentam uma grande amplitude na sua temperatura ótima de crescimento, variando entre (20 e 30) °C. A maioria destes micro-organismos produzem proteases e lipases, que atacam a proteína e gordura do leite, causando putrefação, ranço e mau cheiro (WALSTRA et al.,2006).

Muitas vezes as enzimas produzidas por algumas bactérias podem ser resistentes ao calor e causar mau cheiro além de alterar as propriedades físico-químicas do leite UHT durante o armazenamento. Por exemplo, algumas enzimas podem hidrolisar proteínas, resultando em um leite amargo e, eventualmente, mais ou menos transparente. No leite cru e no tratado por pasteurização lenta, os defeitos de sabor não ocorrem até que os número de UFC de psicrotróficos não ultrapassem de 10^7 UFC/ mL. As colónias das bactérias gram-negativas causam deterioração do leite em um tempo muito curto, sem acidificação (WALSTRA et al.,2006).

1.2.3.1. *Pseudomonas* spp

São os organismos de deterioração mais comumente isolados no leite cru e pasteurizado. A maioria destas bactérias (58 – 91 %) tem a capacidade de mostrar distinta ação proteolítica, enzimática, lipolítica e a atividade fosfolipidolítica (Wiedmann et al.,2000).

Em comparação com outras bactérias psicrotróficas, *Pseudomonas* spp. possui um tempo de geração curto (< 4 h), o que implica que a contaminação com apenas uma única célula microbiana pode levar à números superiores a 10^6 UFC.mL⁻¹ no leite após 8 dias de armazenamento a temperaturas de 4 °C (LANGEVELD e CUPERUS, 1976).

As bactérias psicrotróficas gram-positivas isoladas a partir de leite cru incluem seguintes gêneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* (Washam et al., 1977).

1.2.3.1.1. *Pseudomonas fluorescens*

Pertencem à família das Pseudomonadaceae, apresentam células em forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, com flagelos polares, são aeróbicas

estritas e não formadoras de esporos. *P. fluorescens* é uma grande e heterogênea espécie de bactérias gram-negativas do gênero *Pseudomonas* sendo subdividida em biotipos baseados em diversas características fenotípicas (GUERREIRO et al., 2005). Os membros deste grupo são encontrados tanto como saprófitas de vida livre ou como agentes causadores de deterioração de alimentos de origem vegetal ou animal. Apresentam temperatura ótima de multiplicação entre 25 °C a 30 °C e podem ser encontradas na água e no solo. Estes micro-organismos são capazes de hidrolizar lipídeos e proteínas e causar alterações sensoriais em produtos lácteos como modificação do sabor, cor e aroma (EVANGELISTA, 2003).

O gênero *Pseudomonas*, considerado o mais importante dentre os psicrotróficos, pode ser encontrado em aproximadamente 10 % da microbiota do leite recém-ordenhado, sendo que sob condições de refrigeração este gênero rapidamente predomina na microbiota do leite cru (GUERREIRO et al., 2005). Este gênero é representado por espécies que apresentam os menores tempos de multiplicação em temperaturas entre 0 °C e 7 °C (4 - 12 horas) e podem multiplicar-se em temperaturas tão baixas quanto 10 °C (GUERREIRO et al., 2005).

1.2.4. Outros grupos bacterianos

Coliformes pertencem à família Enterobacteriaceae e são comuns no trato digestivo. Eles incluem *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*, mas vários outros gêneros e espécies estão envolvidos. Eles crescem rapidamente no leite, especialmente acima de 20 °C, e atacam as proteínas e a lactose produzindo CO₂ e alteram o sabor do leite. A pasteurização lenta elimina os coliformes. Estes são utilizados como micro-organismos indicadores (WALSTRA et al, 2006).

Algumas bactérias termodúricas, incluindo *Microbacterium lacticum*, estreptococos termófilos, e certas espécies de *Micrococcus*, não formam esporos, mas as células vegetativas sobrevivem à pasteurização. São eliminadas quando o leite é aquecido a temperaturas acima de 80 °C/ 20 s. Estas bactérias não são muito ativas no leite armazenado a frio, mas são indesejáveis porque elas sobrevivem a temperaturas de pasteurização do leite e podem crescer caso o produto seja submetido às condições favoráveis, especialmente a temperatura ambiente (WALSTRA et al.,2006).

1.2.5 Fontes de contaminação do leite

Deve ser feita uma distinção entre vacas saudáveis e não saudáveis, condição esta pode não ser muito clara, especialmente para alguns tipos de mastite.

1.2.5.1 Vacas saudáveis

Na maioria das fêmeas não há micro-organismos nos alvéolos, condutos, cisterna e na cisterna do teto, mas estão presentes no canal da teta e no esfíncter da tetina, principalmente os sensíveis a altas temperaturas, *Micrococcus*, *Staphylococcus spp.* e *Corynebacterium bovis*. Por vezes, outras bactérias, também estão envolvidas. Durante a ordenha, estas bactérias entram no leite. Imediatamente após a ordenha, o seu número é muito variável entre animais, de quase zero para cerca de 15.000 mL^{-1} . A contagem das colônias do leite tirado assepticamente das vacas saudáveis é geralmente baixa, muitas vezes $<100 \text{ mL}^{-1}$. A 5°C , as bactérias dificilmente crescem e, após pasteurização lenta, estes micro-organismos podem frequentemente não ser detectados (WALSTRA et al.,2006).

1.2.5.2 Vacas insalubres

Quando uma vaca está doente devido a uma infecção microbiana, os micro-organismos envolvidos podem entrar no leite. No caso de mastite, micro-organismos patogénicos já estão presentes no úbere e, deste modo, no leite. Alguns destes micro-organismos mastíticos incluem certos *estreptococos*, *Staphylococcus aureus*, e algumas estirpes de *E. coli*, e são patogénicas para os seres humanos (WALSTRA et al.,2006).

Se o úbere e órgãos estiverem inflamados, os patógenos podem contaminar diretamente o leite através do corpo, especialmente se a vaca também tiver mastite. Naturalmente, os micro-organismos também podem introduzir no leite via contaminação com fezes ou urina. Entre esses micro-organismos os que são patogénicos para os seres humanos são *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis* e *Brucella abortus* (WALSTRA et al.,2006).

1.2.6 Contaminação durante e após a ordenha

As medidas de higiene tomadas durante e após a ordenha (mecânica), são essenciais para determinar quais micro-organismos estarão presentes no leite e a sua contagem.

A contagem de micro-organismos do leite corretamente extraído de vacas saudáveis é de cerca de 10.000 mL^{-1} , às vezes até menos. Se, no entanto, o nível de higiene durante a ordenha for baixo, o leite recém-colhido pode ter uma elevada contagem, até um milhão mL^{-1} . As potenciais fontes de contaminação do leite, juntamente com os micro-organismos envolvidos, serão discutidas nos itens a seguir (WALSTRA et al.,2006).

Durante a ordenha, os micro-organismos podem entrar no leite a partir da pele das tetas, que muitas vezes estão contaminadas por fezes, solo ou poeira. Flocos de pele, cabelos, e sujeira dos pés e flancos também podem contaminar o leite. Vários tipos de micro-organismos podem estar presentes, incluindo coliformes, *streptococos fecals*, outras bactérias intestinais, esporos de bacterianos (principalmente *Clostridium spp.*), leveduras e fungos. Alguns destes micro-organismos são patogênicos a humanos (WALSTRA et al.,2006).

Solo, fezes e poeira podem contaminar o leite e, assim, aumentar a contagem microbiana. Além disso, esporos de bactérias, leveduras, bolores, também podem estar presentes no ar do ambiente de ordenha. O mais frequente é o esporo de *B. subtilis*, originários de pó de feno. Os esporos podem entrar no leite através do ar aspirado durante a ordenha mecânica, ou cair diretamente a ele durante a ordenha em baldes abertos. A limpeza da sala de ordenha e o sossego das vacas durante ordenha estão entre os fatores que determinam a contaminação do leite (WALSTRA et al.,2006).

A ração ou a alimentação natural do animal geralmente contém um grande número de micro-organismos. Certos micro-organismos presentes no alimento podem sobreviver à passagem do trato digestivo e, posteriormente, introduzirem-se no leite através das fezes. Neste grupo de micro-organismos estão incluídos alguns patógenos para os humanos tais como, esporos de algumas bactérias, incluindo *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, e *Clostridium tyrobutyricum*, que podem causar a deterioração do leite e produtos lácteos. Um grande número de *C. tyrobutyricum* ocorre na silagem de baixa qualidade (WALSTRA et al.,2006). Desta forma a

qualidade da silagem é de suma importância, e a contaminação do leite, por exemplo, por estrume, deve ser rigorosamente controlado.

Equipamentos de ordenha mal higienizados podem conter um grande número de micro-organismos. Os métodos de higienização aplicados nos equipamentos de ordenha devem diminuir os micro-organismos contaminantes. Se o uso de altas temperaturas durante a limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha for satisfatório, sobreviveram as espécies resistentes ao calor, incluindo micrococos, *Microbacterium lacticum*, alguns estreptococos, e bactérias formadoras de esporos. É fundamental que os equipamentos de ordenha sejam adequadamente higienizados (WALSTRA et al.,2006).

A água utilizada na sala de ordenha pode ser de boa qualidade, mas é sempre necessário que sejam feitos testes de qualidade. A água retida na superfície da sala de ordenha pode conter vários micro-organismos, incluindo patógenos ao ser humano, portanto, não deve em caso algum, ser utilizada para higienização, pois, pode conter bastonetes gram-negativos tais como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, e *Alcaligenes spp* (WALSTRA et al.,2006).

Os ordenhadores influenciam muito nos fatores já mencionados anteriormente e na qualidade microbiológica do leite. Eles podem também contaminar o leite diretamente, por exemplo, com as mãos. Se são portadores de alguma infecção microbiana, podem contaminar diretamente o leite com patógenos (WALSTRA et al.,2006).

1.2 Métodos de conservação do leite

Sendo o leite um alimento de grande importância na alimentação devido ao seu elevado valor nutritivo, por isso é considerado um ótimo substrato para o crescimento de vários grupos de micro-organismos, desejáveis e indesejáveis. Estes micro-organismos podem ser eliminados ou reduzidos a níveis aceitáveis por meio dos métodos de conservação descritos na tabela 3.

Tabela 1.3. Métodos de conservação do leite

Tecnologia	Vantagens	Desvantagens
Tratamento térmico (pasteurização/UHT)	• Evita transmissão de doenças reduzindo a carga bacteriana do leite; • Prolonga a vida-de-prateleira do leite e derivados;	• Reduz bactérias lácticas benéficas do leite; • Altera o sabor do leite; • Desnaturação das proteínas do leite relevantes na produção de alguns derivados lácteos (ex: queijo); • Não elimina os micro-organismos, nem a ação nociva das toxinas, logo que a temperatura se torne favorável retomam a atividade.
Refrigeração	• Retardar as reações químicas e atividade enzimática; • Retarda ou inibi o crescimento e a atividade dos micro-organismos nos alimentos. • Evitar a alteração ou decomposição das características dos alimentos preservando as suas qualidades nutricionais e organolépticas.	

1.3 Bacteriófagos

Estima-se que no planeta existam aproximadamente 10^{32} bacteriófagos, os quais são considerados seres ubíquos (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005). Estão, em geral, presentes em altas concentrações em água e alimentos de diferentes origens, podendo ser encontrados em diferentes produtos na ordem de 10^8 Unidades Formadoras de Placas/g (PFU/g) (SULAKVELIDZE e BARROW, 2005).

A palavra fago vem do grego “comer ou devorar”. No entanto, os bacteriófagos são definidos na atualidade como parasitas intracelulares virais obrigatórios que dependem de metabolismo bacteriano para produzir proteínas e partículas virais (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005). Apresentam especificidade, em parte mediada por proteínas associadas à cauda, que distintamente reconhecem moléculas susceptíveis da superfície da bactéria (STEVEN & LOESSMER, 2007).

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) classifica os bacteriófagos com base no tipo de morfologia e de ácidos nucleicos em 10 famílias, e os agrupa em vários tipos básicos, a segundo o tipo de material genético: DNA de fita simples (ssDNA), DNA de fita dupla (dsDNA), RNA de fita simples (ssRNA) e RNA de fita dupla (dsRNA) (ACKERMANN, 2005; ICTV, 2012).

A grande maioria dos bacteriófagos estudados com o objetivo de biocontrole e identificação de bactérias faz parte da ordem dos *Caudovirales* e apresentam caudas com comprimentos variáveis e cabeças icosaédricas contendo dsDNA (HAGENS E LOESSNER, 2007). Esses bacteriófagos podem ser classificados em três grupos morfológicos: *Myoviridae* (caudas contráteis, longas e rígidas), *Podoviridae* (caudas não contráteis e curtas) e *Siphoviridae* (caudas não contráteis, longas e flexíveis) (GREGORACCI et al. 2006; MONK et al., 2010).

Os bacteriófagos podem ser líticos ou lisogênicos de acordo com o ciclo de replicação envolvido na infecção do hospedeiro (Figura 1), (HAGENS e LOESSNER, 2007). Abedon (2008) classifica os bacteriófagos segundo o tipo de infecção em seis níveis: lítico, crônico, lisogênico, pseudolisogênico, restrito, abortivo, resistente e parcialmente resistente. A infecção lítica se apresenta

quando o bacteriófago adere a receptores presentes na superfície bacteriana que podem ser proteínas, peptídeoglicano, lipopolissacarídeos, flagelos ou fimbrias, injeta o material genético no citosol da bactéria, por meio da contração da cauda e induz a lise do hospedeiro. Neste momento são liberados em torno de 100 novos bacteriófagos para infectar novas células (HANLON, 2007). Este rompimento é facilitado pelo acúmulo de enzimas, que enfraquecem e destroem a parede e a membrana bacteriana, além da pressão exercida pelo aumento da quantidade de partículas no interior da bactéria (SKURNIK e STRAUCH, 2006; HAGENS e LOESSNER, 2007).

Bacteriófagos líticos são incapazes de integrarem-se no genoma do hospedeiro. Com o sucesso da infecção sempre ocorre a inativação do hospedeiro e em geral apresentam amplo espectro (HAGENS e LOESSNER, 2007). Os bacteriófagos que desenvolvem o ciclo lítico são os que apresentam uso potencial no controle biológico de bactérias, pois levam à lise bacteriana.

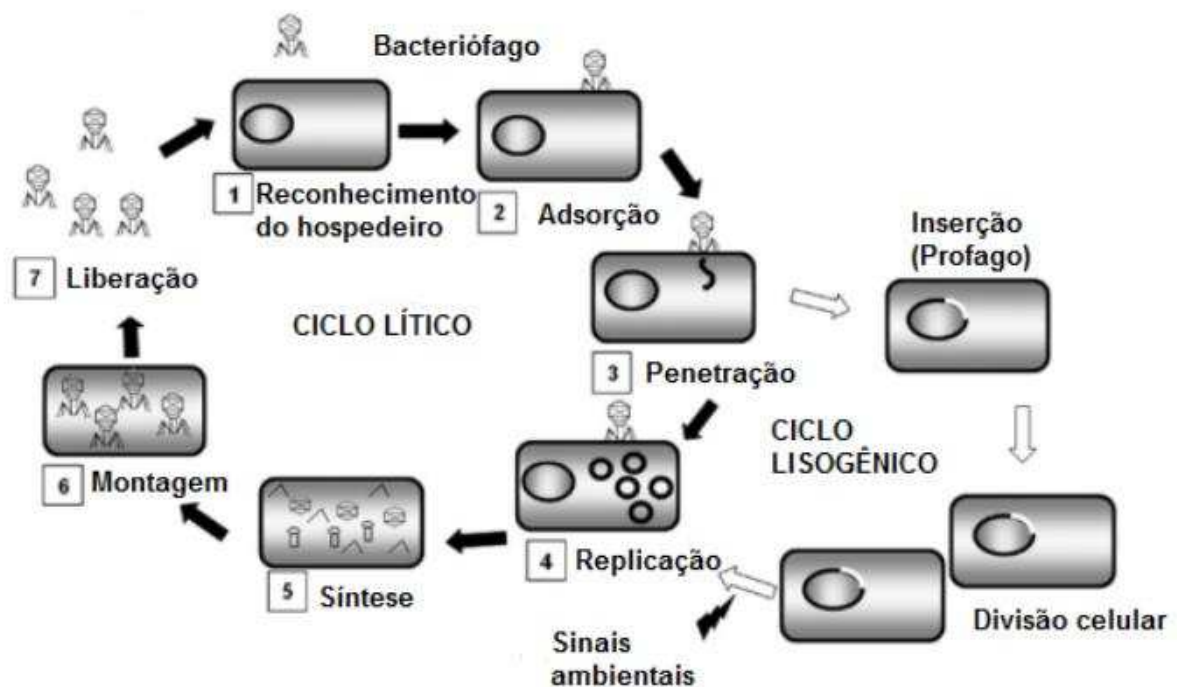


Figura 1.1. Ciclos de infecção de bacteriófagos.

Fonte: García et al.,(2010) adaptado.

1.4. Uso de bacteriófagos no biocontrole de bactérias patogênicas

Bacteriófagos têm sido indicados para prevenir ou reduzir a colonização de doenças em animais, para descontaminação de carcaças, para desinfecção

de equipamento e superfícies de contato e para estender a vida útil de alimentos perecíveis, e suas enzimas também podem ser usados como conservantes naturais (Figura. 2), (LEVERENTZ et al., 2001; GREER, 2005; MARTINEZ et al., 2008; BIGWOOD et al., 2008; HUNGARO et al., 2013).

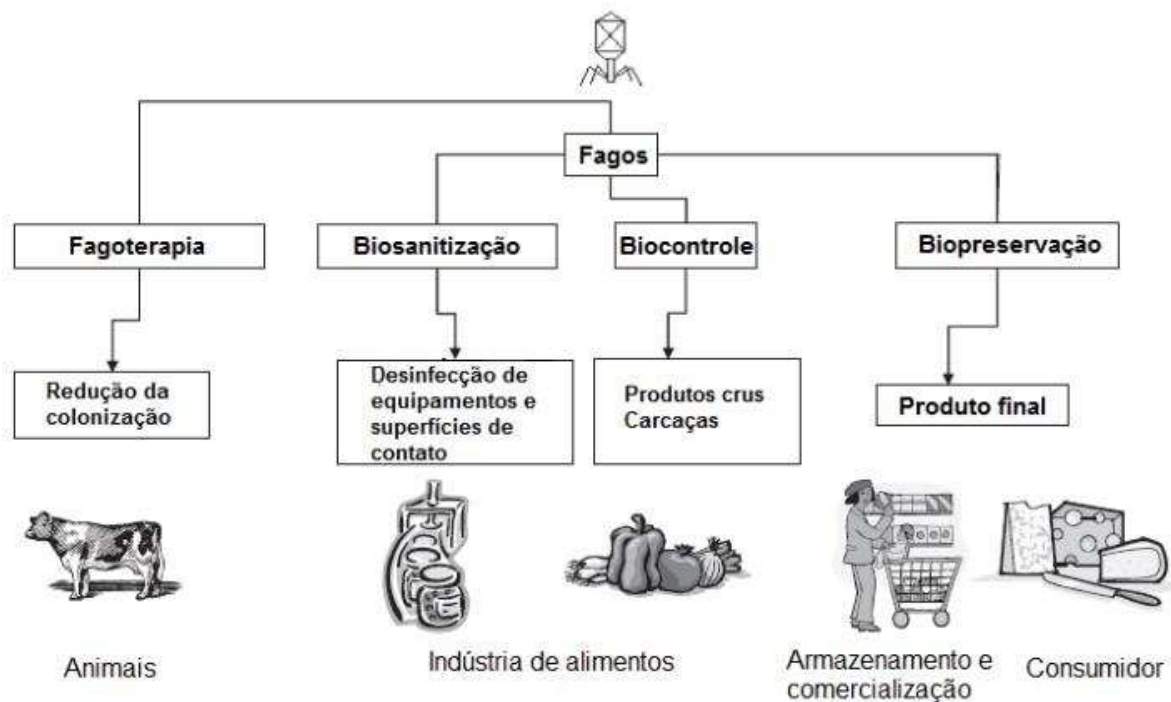


Figura 1.2. Exemplos de aplicação de bacteriófagos ao longo da cadeia produtora de alimentos.

Fonte: Martinez et al., (2008) adaptado.

A utilização de bacteriófagos na produção de alimentos tem sido proposta como alternativa para a indústria de alimentos como um método de controle biológico em toda a cadeia aumentando a segurança especialmente de alimentos frescos (HAGENS e LOESSNER, 2010; GARCIA et al., 2010).

Segundo Sillankorva et al. (2012), bacteriófagos oferecem vantagens como agentes de biocontrole por várias razões:

- a) Especificidade para atingir seu hospedeiro alvo determinado pelos receptores presentes na parede celular bacteriana, deixando intacta a microbiota restante. Esta propriedade favorece os bacteriófagos em relação a outros antimicrobianos que podem causar danos colaterais à microbiota;

- b) A autorreplicação e autolimitação, o que significa que os bacteriófagos vão multiplicar enquanto o hospedeiro ainda exista, multiplicando o seu impacto antimicrobiano global;
- c) Como as bactérias desenvolvem mecanismos de defesa contra os bacteriófagos para sua sobrevivência, os bacteriófagos se adaptam continuamente a estes sistemas de hospedeiros alterados;
- d) Baixa toxicidade inerente, uma vez que consistem principalmente de ácidos nucleicos e proteínas;
- e) Baixo custo e simplicidade de manipulação;
- f) Tolerância a condições adversas dos alimentos.

A pesquisa sobre os bacteriófagos tem intensificado nos últimos dez anos e se expandiu para além do laboratório. Produtos a base de bacteriófagos já foram aprovados e estão sendo comercializados. Em 2006, o Food And Drug Administration (FDA), aprovou o uso e a preparação de bacteriófagos como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) como aditivos alimentares para o controle da bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* em carne de aves e derivados. Na Europa, o uso de Listex também foi aprovado na Suíça para fabricação de queijos e, recentemente, a aprovação se estendeu para outros tipos de alimentos. O Listex também foi aprovado para uso no processamento de alimentos pelo *Food Standards* Austrália e Nova Zelândia (FSANZ) em 2012. Vários produtos utilizando fagos são atualmente produzidos em escala comercial (LY-CHATAIN, 2014).

A ocorrência, a viabilidade e o período de armazenamento dos bacteriófagos são afetados por diferentes fatores, tais como a temperatura, acidez, salinidade e presença de íons. Estes fatores podem inativar os bacteriófagos por meio de danos em seus elementos estruturais (cabeça, cauda e envelope), perda de lipídeos ou DNA e mudanças estruturais (ACKERMANN et al. 2004). No entanto, a capacidade que os bacteriófagos têm para sobreviver em condições desfavoráveis é bastante diversificada (JONCZYK et al. 2011).

A acidez do ambiente em que os bacteriófagos se encontram é um fator fundamental que determina a sobrevivência e a persistência dos bacteriófagos naquele ambiente. A maioria dos bacteriófagos podem ser armazenados

durante longos períodos de tempo em pH entre (6 e 8), em solução ou na forma seca (JONCZYK et al. 2011). Contudo, o título dos bacteriófagos tende a diminuir com o abaixamento do pH.

O choque osmótico tem sido apontado como inativador de bacteriófagos (DAVIS et al. 1985; KERBY et al. 1949; SHARP et al. 1946). Whitman e Marshall (1971) observaram que bacteriófagos de *Pseudomonas* (WY e PS1) apresentaram viabilidade reduzida em soluções altamente concentradas de NaCl ou sacarose. Os bacteriófagos PS1 diluídos em 4 mol.L⁻¹ de NaCl mostraram uma diminuição de 99 % da viabilidade, enquanto que a viabilidade do bacteriófagos WY foi reduzida em apenas 26 %. No entanto, uma solução 2 mol.L⁻¹ de sacarose causou uma diminuição na viabilidade de PS1 em 50 % e de 48 % em WY.

A temperatura vem sendo citada como um fator crítico para a sobrevivência dos bacteriófagos (OLSON et al., 2004; NASSER e OMAN, 1999; YATES et al., 1985; HURST et al., 1980). Segundo esses pesquisadores, a temperatura desempenha um papel fundamental na ligação, penetração, multiplicação e na duração do período de latência. De acordo com Tey et al., (2009) temperaturas mais elevadas podem prolongar a duração do estado de latência de bacteriófagos. E em temperaturas inferiores à ótima, menor quantidade de material genético dos bacteriófagos penetra nas células bacterianas hospedeiras e, portanto, menos deles pode ser envolvido na fase de multiplicação. Além disso, a temperatura determina a ocorrência, a viabilidade e período de armazenamento de bacteriófagos (JONCZYK et al. 2011).

Bacteriófagos podem ser inativados exponencialmente por luz ultravioleta a taxas variáveis (ADAMS et al., 1959), isto ocorre geralmente devido a danos causados no DNA. Iriarte et al. (2007), mostraram que a fonte de luz fluorescente reduziu bacteriófagos de *Xanthomonas* em duas semanas e a intensidade da irradiação UV apresentou correlação positiva com o declínio da população de fagos afetando drasticamente sua sobrevivência.

Alguns produtos químicos antissépticos em concentrações variadas inativam as partículas de bacteriófagos, incluindo ácido peracético, etanol e hipoclorito de sódio (BINETTI e REINHEIMER, 2000; SUAREZ e

REINHEIMER, 2002). Embora existam estudos sobre a resistência de colifagos ao cloro (KENNEDY e BITTON, 1987).

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABEDON, S.T. Phages, ecology, evolution. P. 1-28. In: S.T. Abedon (ed.), **Bacteriophage Ecology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2008.
- ACKERMAN, H.W. Bacteriophage classification. In: KUTTER, E; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 67-90, 2005.
- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. **Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment**. Journal of Dairy Science, 59, 823-827, 1976.
- ATTERBURY, R.J.; MAP, V.B.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.A.; HARRIS, J.A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J.A.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. **Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens**. Applied and Environmental Microbiology. 73:4543-4549. 2007
- BIGWOOD, T.; HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.V.; HEINEMANN, J.A. **Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat**. Food Microbiology 25, 400–406. 2008.
- BINETTI, A.G.; REINHEIMER, J.A. **Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants**. Journal of Food Protection, 63, (4). 509-515, 2000.
- DAVIS, C.; SILVEIRA, N.F.A.; FLEET, G.H. **Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines**. Applied and Environmental Microbiology, 50, 872-876, 1985.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 467p.
- FAOSTAT data. **Food and Agriculture Organisation, Rome. 2005a** <http://faostat.external.fao.org/default.jsp> (accessed Abril, 2016).
- FOX, P.F., UNIACKE-LOWE, T., MCSWEENEY, P.L.H., O'MAHONY, J.A. Dairy Chemistry and Biochemistry. **Food Science & Nutrition. ISBN: 978-3-319-14892-2. 2015.**
- GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, A.; MARTÍNEZ, B. **Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins**. Trends in Food Science and Technology, 21, 373-382, 2010.
- GREER, G.G. **Bacteriophage control of foodborne bacteria**. Journal of Food Protection, 68, 1102-1111, 2005.
- GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D.; BROCCHI, M. **The biology of bacteriophages**. In: WEGRZYN, G. Modern bacteriophage biology and biotechnology. Kerala: Research Signpost (in press), 2006. 36p.

- GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO.; FRANZENER, A.S.M. **Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção**. Ciência Agrotecnica, 29, (1), 216-222, 2005.
- HAGENS, S.; LOESSNER, M.J. **Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens**. Applied Microbiology and Biotechnology 76, 513–519. 2007.
- HAGENS, S.; OFFERHAUS, M.L. **Bacteriophages - New weapons for food safety**. Food Technology, 62, (4), 46-54, Apr., 2008.
- HANLON, G.W. **Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections**. International Journal of Antimicrobial Agents. v. 30, p. 118-128, 2007.
- HUNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S.; GOUVÊA, D.M.; VANETTI, C.D.; PINTO, C.L.O. **Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents**. Food Research International, 52, 75-81, 2013.
- HURST, C.J.; GERBA, C.P.; CECH, I. **Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil**. Applied and Environmental Microbiology, 40, 1067-1079, 1980.
- ICTV (2012). **Virus taxonomy**: release. EC 44, Leuven, July 2012.
- INE (Instituto Nacional de Estatísticas) (2010). **Estatísticas de Moçambique**. Maputo: Instituto Nacional de Estatísticas.
http://www.ine.gov.mz/indicadores_macro_economicos/cn/pib/Document.2014-06-16.8708501568. Acesso: 08/03/2015.
- IRIARTE, F.B.; BALOGH, B.; MOMOL, M.T.; SMITH, L.M.; WILSON, M.; JONES, J.B. **Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces**. Applied and Environmental Microbiology, v. 73, n. 6, p. 1704-1711, 2007.
- JONCZYK, E.; KLAKE, M.; MIEDZIBRODZKI, R.; GORSKI, A. **The influence of external factors on bacteriophages - review**. Folia Microbiologica, 56, 191-200, 2011.
- KENNEDY, J.E. JR.; BITTON, G. **Bacteriophages in foods**. In: Phage ecology. Goyal, S.M.; Gerba, C.P.; Bitton, G. New York, USA, John Wiley and Sons, 289-316, 1987.
- KERBY, G.P.; GODWY, R.A.; DILLON, E.S.; DILLON, M.L.; CSÁKY, T.Z.; SHARP D.G.; BEARD, J.W. **Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli***. The Journal of Immunology, 63, 93-107, 1949.
- KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. United States of America: CRC Press, 2005. 510p.
- LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; CAMP, M.J.; JANISIEWICZ, W.J.; FUCHS, Y.; CAMP, M.J.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A. **Examination of bacteriophage as biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study**. Journal of Food Protection, 64, 1116-1121, 2001.

Lucitojal (2010). **Alimentos e Nutrição – processamento e alterações**. http://lucitojal.blogspot.com.br/2010/04/leite-e-derivados_15.html. Acesso: 13/03/2016

LY-CHATAIN, M.H. **The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy**. *Frontiers in Microbiology*, 5, (51), 1-7, 2014.

MARTINEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRIGUEZ, A; GARCIA, P. **Nisin-bacteriophage cross resistance in *Staphylococcus aureus***. *International Journal of Food Microbiology*. 122, 253–258, 2008.

MONK, A.; REES, C.; BARROW, P.; HAGENS, S.; HARPER, D. **Bacteriophage applications: where are we now**. *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, p. 363-369, 2010.

NASSER, A.; OMAN, S. **Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources**. *Water Research*, 33, 1748–1752, 1999.

OLSON, M.R.; AXLER, R.P.; HICKS, R.E. **Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability**. *Journal of Virological Methods*, 122, 147-152, 2004

REZER, A.P.S. **Avaliação da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul**. 2010, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SHARP, D.G.; HOCK, A.; TAYLOR, A.E.; BEARD, D.; BEARD, J.W. **Sedimentation characters and pH stability bacteriophage of *Escherichia coli***. *The Journal of Biological Chemistry*, 165, 259-270, 1946.

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

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. **Phage therapy: Facts and Fiction**. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 5-14, 2006.

STEVEN, H.; LOESSMER, M.J. **Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 513-519, 2007.

SUAREZ, V.B.; REINHEIMER, J.A. **Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis*, phages**. *Journal of Food Protection*, 65, (11), 1756-1759, 2002.

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

TEY, B.T.; OOI, S.T.; YONG, K.C.; TAN, N.G.; LING, T.C.; TAN, W.S. **Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen**. *African Journal of Biotechnology*, 8, 268-273, 2009.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2012). **Foreign Agricultural Service**. Creating a sustainable Dairy Industry in Mozambique.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. New York: CRC, 2006. p.166-167.

WHITMAN, P.A.; MARSHALL, R.T. **Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef**. Journal of Applied Microbiology, 22, 463-468, 1971.

YATES, M.V.; GERBA, C.P.; KELLEY, L.M. **Virus persistence in ground water**. Applied and Environmental Microbiology, 31, 778-781, 1985.

CAPITULO 2

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS LÍTICOS CONTRA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

RESUMO

Embora a capacidade deteriorante de *P. fluorescens* seja bem conhecida, existem poucos estudos que avaliam a utilização de bacteriófagos no controle desta espécie na indústria de laticínios. O presente estudo descreve o isolamento e a caracterização de bacteriófagos para *P. fluorescens* (NCTC 10038) isolados de amostras de água residuária de vários setores de uma indústria de laticínio. Foram isolados seis bacteriófagos, dos quais três (UFV-SG, UFV-HD e UFV-HQ) foram avaliados frente a diferentes condições encontradas na indústria de alimentos e produtos antimicrobianos, uma vez que foram aqueles que apresentaram diferenças quando realizado o estudo de perfil pormifórmico. Determinou-se também os parâmetros cinéticos de crescimento destes bacteriófagos. Os bacteriófagos estudados atingiram concentrações em torno de 10^9 PFU.mL⁻¹, apresentando uma taxa de absorção aproximada de $1,83 \times 10^{-9}$ mL.min⁻¹. A cada ciclo de infecção bacteriana foram liberados aproximadamente 200 bacteriófagos. Os bacteriófagos avaliados apresentaram sensibilidade à luz UV, à pasteurização lenta, a álcool 70, a álcool gel, a ácido peracético; a desincrustante ácido para inox e a detergente alcalino para lavagem CIP. Todavia foram resistentes a condições, tais como exposição aos sanitizantes: dicloroisocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio, à pasteurização rápida, a alguns sais e ácidos, mostrando potencial para utilização na indústria de alimentos. Os resultados desse estudo sugerem a possibilidade de utilização destes bacteriófagos como agentes de biocontrole em alimentos com baixa concentração de sais e ácidos. sem que afetem a produção na indústria de laticínios.

PALAVRAS-CHAVE: bacteriófagos, deterioração, *P. fluorescens*, leite, biocontrole.

1. Introdução

O leite e produtos lácteos são um dos alimentos mais produzidos e consumidos em todo o mundo. A estimativa da produção mundial de leite e dos derivados lácteos em 2015 foi de aproximadamente 800 689 milhares de toneladas (FAO, 2015). O leite cru é rico em proteínas, lipídios e algumas vitaminas e minerais. Assim, a qualidade nutricional e algumas características físico-químicas tornam este alimento suscetível a deterioração devido ao crescimento de micro-organismos (Corrêa et al. 2011).

A conservação do leite por meio da refrigeração é uma prática regular na indústria de alimentos. Apesar desta prática ser muito útil para evitar a proliferação da maioria dos micróbios, bactérias psicrófilas podem multiplicar-se sob temperatura de refrigeração. O gênero principal presente é *Pseudomonas*, sendo *P. fluorescens* a estirpe mais importante que provoca a deterioração do leite. Embora o uso de pasteurização seja eficaz para prevenir agentes patogênicos, bactérias do gênero *Pseudomonas* permanecem viáveis após a pasteurização (JAY, 2005).

Uma alternativa para a conservação de leite é o uso de bacteriófagos específicos para o gênero *Pseudomonas*, em combinação com a temperatura baixa ou elevada para impedir ou minimizar estes problemas de contaminação. Bacteriófagos são vírus que necessitam do metabolismo bacteriano para sua replicação, são considerados parasitas intracelulares obrigatórios por falta de metabolismo próprio. Devido a sua atuação sobre as bactérias, os bacteriófagos desempenham uma função fundamental na regulação da ecologia microbiana em diversos ecossistemas (HUNGARO et al., 2014). Portanto, os fagos são utilizados como uma ferramenta para evitar a proliferação de bactérias e para garantir maior vida de prateleira dos alimentos. Estudos de biocontrole usando bacteriófagos têm aumentado nos últimos anos, principalmente devido ao aparecimento da resistência bacteriana a um grande número de agentes antimicrobianos. Aplicação de bacteriófagos para os seres humanos e para os animais já está sendo executado, no entanto, há poucos estudos sobre ambientes industriais e a utilização de bacteriófagos como agentes sanitizantes.

O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar cinética e morfológicamente bacteriófagos específicos para *P. fluorescens* com potencial para utilização na indústria de laticínios.

2.2. Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrico (LAMPOAH), do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

2.2.1. Micro-organismos

Na realização desta pesquisa as estirpes utilizadas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). *Pseudomonas fluorescens* NCTC (10038) foi utilizada como hospedeiro no processo de isolamento, propagação e estudo da cinética dos bacteriófagos.

2.2.2. Isolamento e purificação dos bacteriófagos

Para o isolamento de bacteriófagos líticos para *P. fluorescens* utilizou-se a metodologia adaptada de Wall et al. (2010). Os bacteriófagos foram isolados de água residuária da fábrica de laticínios da Universidade Federal de Viçosa, coletada em diferentes setores (setor de produção de queijo, doce de leite, manteiga e de embalagem de leite). Um mililitro de amostra de água residuária foi centrifugado (Mikro 200-R) a 13000g por 10 min. O pellet foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado 5 mL de caldo triptona de soja (TSB-Fluka®) e um inóculo de 1 mL de cultura de *P. fluorescens* na fase log, seguido de incubação sob agitação em shaker (Solab, SL 221) por 130 rpm a 30 °C/24 h. Após este período, a suspensão foi centrifugada (Beckman J2-MC) a 8000g por 20 min e filtrada em membrana de éster de celulose (Milipore® 0,22 µm de poro, 25 mm de diâmetro). A detecção da presença dos bacteriófagos na suspensão foi realizada por meio da técnica de microgotas em superfície adaptada por Hungaro et al. (2013).

Para a purificação dos bacteriófagos foram adicionados 100 µL da suspensão de bacteriófagos isolados a 100 µL da cultura bacteriana de *P. fluorescens* incubada a 30 °C/16 - 18 h. A suspensão resultante foi incubada a 30 °C/30 minutos. Em seguida, adicionou-se a suspensão em tubo com 5 mL

de sobrecamada ágar TSA (TSB + 0,7 % de ágar-ágar, Himedia®). Essa mistura foi vertida em placa de Petri contendo ágar base triptona de soja (TSB + 1,2 % ágar-ágar) e incubada a 30 °C/16 - 18 h. Após a incubação, as lises foram removidas com auxílio de pipeta e colocadas em 5 mL de cultura ativa do hospedeiro e incubadas novamente a 30 °C por 16 - 18 h. Para cada bacteriófago, três ciclos de purificação foram realizados, a fim de garantir a pureza do estoque de bacteriófagos.

2.2.3. Propagação dos bacteriófagos

Os bacteriófagos foram propagados segundo a metodologia adaptado de Hungaro et al. (2013). Adicionou-se 1 mL de *P. fluorescens* e 100 µL das suspensões de fagos a 5 mL de meio TSB. A suspensão resultante foi incubada em estufa a 30 °C /24 h até a completa lise celular, seguida pela adição de 5 mL de solução tampão SM (50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl (Sigma Aldrich®) [pH 7,5], 0,1 mol.L⁻¹ NaCl (Vetec®), 8 mmol.L⁻¹ MgSO₄ (Chemco®).7 H₂O, 0,01 % gelatina (Difco®)). A suspensão foi incubada sob agitação a 130 rpm a 30 °C em shaker (Solab, SL 221) por 24 h. Após este período, o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado e centrifugado (Beckman J2-MC) a 2.000g por 20 min a 4 °C para diminuir a quantidade de células bacterianas em suspensão. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose (Milipore®, 0,22 µm de poro). O filtrado foi armazenado em tubo de ensaio esterilizado e mantido sob refrigeração para posterior utilização.

2.2.4. Titulação e contagem dos bacteriófagos na suspensão

Para determinação da concentração de bacteriófagos na suspensão foi utilizado tampão SM para realizar as diluições decimais necessárias a fim de obter contagem de Unidades Formadoras de Placas (PFU) entre 10 e 100 por mL de suspensão.

Foram utilizados 500 µL de *P. fluorescens*, cultivada em TSB (Fluka®) a 30 °C/ 6-9 h e posteriormente acrescido de 5 mL de ágar sobrecamada (TSB + 0,7 % de ágar-ágar, Himedia®). Essa mistura foi vertida em placa de Petri contendo ágar base triptona (TSA) (TSB + 1,2 % ágar-ágar) para formação de um “tapete de crescimento” do hospedeiro. Sobre a superfície do tapete nas placas de ágar foram adicionados 10 µL de diluição seriadas da suspensão de

bacteriófagos (9 a 10 pontos equidistantes na placa), seguido de incubação a 30 °C durante 16 - 18 h. Cada ponto correspondia a uma diluição específica da suspensão de bacteriófago.

A diluição da última e penúltima lise evidente foram plaqueadas para a contagem de unidades formadoras de placas (PFU), 500 µL de *P. fluorescens* em fase log cultivado em caldo TSB (Fluka®) foram adicionados juntamente a 100 µL da diluição do bacteriófago em 5 mL de sobrecamada (TSB + 0,7 % de ágar-ágar, Himedia®) e vertida em placas contendo TSA (TSB + 1,2 % ágar-ágar). As placas de lise foram determinadas após período de 16 a 18 horas de incubação a 30 °C. Após este período, procedeu a contagem do número de placas de lise e foi calculado o título dos bacteriófagos em PFU·mL⁻¹.

2.2.5. Avaliação da gama de hospedeiros dos bacteriófagos

Foram utilizados diferentes gêneros e espécies de culturas bacterianas de importância em alimentos provenientes do LAMPOAH e LAPROBIQ (Laboratório dos processos bioquímicos) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA). Usou-se nos ensaios: *P. aeruginosa* (ATCC 25619), *Escherichia coli* O157:H7 (CDC EDL-933), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhi (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25904), *Acetobacter aceti* (ATCC 15973), *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 10830), *Pediococcus acidilactic* (CRG – IZ 009), *Gluconobacter* (ATCC 23774).

A especificidade foi determinada utilizando a técnica de microgotas em superfície proposta por Hungaro et al. (2013), onde 10 µL de cada suspensão de bacteriófagos era depositado sobre a superfície de placas contendo um “tapete” das culturas seguido de incubação nas temperaturas de (30 ou 37) °C por 18 a 24 h, de acordo com a condição ótima de crescimento de cada micro-organismo. Os testes foram conduzidos em triplicata.

2.2.6. Diversidade genética entre os isolados pelo perfil de polimorfismo

Foi realizada análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genômico (RFLP), para avaliação da diversidade genética entre os seis bacteriófagos isolados neste estudo. A extração do DNA e ensaio de restrição foi desenvolvido de acordo com Kumari et al. (2009).

Em 750 μL de cada suspensão de bacteriófago purificado foram adicionados 3,75 μL de RNase deixando em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente ($\pm 24\text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida, foram adicionou-se 37,5 μL Proteinase K (Promega[®]) e 1,35 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) (USB[®]). Após homogeneização adicionou-se fenol-clorofórmio (Sigma Aldrich[®]) na proporção de 1:1 (v/v) e deixou-se em repouso durante 5 min para desproteinização. Em seguida, foi feita a centrifugação a 9950g por 10 min (centrifuga MIKRO 200-R). O sobrenadante foi recolhido e a etapa de desproteinização repetida adicionando-se clorofórmio (Sigma Aldrich[®]) na proporção de 1:1 (v/v) e deixando em repouso por 5 minutos. Novamente foi feita uma centrifugação nas condições já citadas. O sobrenadante foi recolhido e adicionado de 200 μL de acetato de amônio (Vetec[®]) 10 M para concentração final de 3,0 M. Após esta etapa foram adicionados 600 μL de isopropanol (Vetec) seguido de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 2 horas para precipitar o DNA. Transcorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 9950.g/ 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet deixado para secar à temperatura ambiente ($\pm 24\text{ }^{\circ}\text{C}$) por aproximadamente 5 min. Adicionou-se então 200 μL de etanol (Vetec[®]) 70 % para remoção de sais. Novamente centrifugou-se a 9950.g/10 min, descartou-se o etanol (sobrenadante) tendo-se o cuidado para não remover o pellet. O pellet foi seco em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 10 min. Após a secagem adicionou-se ao pellet 50 μL de água ultrapura gelada ressuspensando o pellet por homogeneização durante 30 s.

O ensaio de restrição enzimática do DNA dos bacteriófagos isolados foi realizado segundo a metodologia descrita por Kumari et al. (2009). Utilizou-se as endonucleases de restrição: *Hind* III (Sigma Aldrich[®]), *EcoR* I (Sigma Aldrich[®]), *Xba* (Sigma Aldrich[®]), *Alu* I (Sigma Aldrich[®]), *Hae* III (Biolabs[®]), *Hinf* I (Biolabs[®]) e *Xho* I (Sigma Aldrich[®]). Para cada 0,5 μL de enzima adicionou-se 12,3 μL de água ultra pura, 5 μL de DNA, 2,0 μL (10x) de tampão da enzima (Sigma Aldrich[®]) e 0,2 μL de albumina de soro bovino acetilado (BSA) (Promega[®]). A digestão de restrição ocorreu a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 4 h em banho-maria (Fanem[®]) e posteriormente 10 μL da reação foi adicionada a 5 μL de azul de bromofenol (Biosolve LTD). A solução foi aplicada em gel de agarose 1,5 % (Sigma Aldrich[®]), eluída em tampão TE 1x (40 mmol^{-1} Tris-acetato (Sigma

Aldrich®) e 1 mmol⁻¹ EDTA (Sigma Aldrich®), pH 8,0), com 2 µL de corante (Biolabs®) e 5 µL de tampão de corrida *Gel Loading Dye Blue* (Biolabs®), utilizando 1 µL de marcador DNA Ladder (1 Kb, Biolabs®) a 90 V por 1 h. A visualização dos fragmentos foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat) e foto documentado utilizando o sistema Quantum ST4-1000/26mX.

2.2.7. Cinética de adsorção do bacteriófagos

A eficiência da adsorção dos bacteriófagos para o hospedeiro foi estimada segundo a metodologia modificada proposta por Adams (1959), utilizando cultura de *P. fluorescens* em fase logarítmica de crescimento. O experimento foi realizado à temperatura ambiente (± 24 °C), sob agitação constante a 100 rpm. Foi feita a padronização do bacteriófago e da cultura de *P. fluorescens* nas concentrações aproximada de $1,0 \times 10^6$ PFU.mL⁻¹ e $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ respectivamente (Multiplicidade de infecção MOI = 0,01). Em seguida, adicionou-se 100 µL do fago e 100 µL de bactérias em 800 µL de meio de cultura TSB (Fluka®) pré - aquecido a 30 °C. O início da mistura representou o ponto de tempo zero, obtiveram-se oito pontos de dados por curva de adsorção correspondendo aos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 min. Determinou-se o número de bacteriófagos livres para cada intervalo de tempo centrifugando as amostras (Mikro 200-R) a 10000g por 5 min e posteriormente filtradas em filtros de membrana de acetato celulose (Milipore®, 0,22 µm de poro, 25 mm de diâmetro) e foi feito o plaqueamento de cada tempo por meio da técnica de microgotas em superfície adaptada por Hungaro et al.(2013). Posteriormente, construiu-se o gráfico do logaritmo natural (Ln) do número de bacteriófagos livres versus o tempo de adsorção. A constante de adsorção (K) é igual ao oposto da inclinação resultante dividida pela a densidade de bactérias (N):

$$K = -slope / N$$

2.2.8. Características de crescimento dos bacteriófagos

Foi feito o estudo dos parâmetros do ciclo de crescimento dos bacteriófagos (período de latência e *Burst Size*), esses parâmetros foram determinados a partir da mudança dinâmica do número total de bacteriófagos

livres em cada tempo. Neste estudo, foi utilizada a metodologia adaptada proposta por Pajunen et al. (2000). O experimento foi realizado à temperatura ambiente ($\pm 24\text{ }^{\circ}\text{C}$), sob agitação constante 100 rpm. Foi feita a padronização do bacteriófago e da cultura de *P. fluorescens* para concentração aproximada de $1,0 \times 10^6$ PFU.mL⁻¹ e $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ respectivamente (MOI = 0,01). Em seguida, adicionou-se 100 μL do bacteriófago e 100 μL de bactérias em 800 μL de meio de cultura TSB (Fluka®) pré-aquecido a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. A suspensão foi incubada a 100 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 2 min. Posteriormente, foi feita a centrifugação (Mikro, 200-R) a 13000g/ 5 min e determinou-se o número de bacteriófagos livres no sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de caldo TSB (Fluka®), adicionou-se 100 μL da solução em 249,9 mL de caldo TSB (Fluka®) pré-aquecido e manteve-se à temperatura ambiente ($\pm 24\text{ }^{\circ}\text{C}$). Foi feito o acompanhamento do número de bacteriófagos livres em função do tempo (0, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 e 25 minutos). A cada minuto, aliquotas de 1 mL foram filtradas em filtros de membrana de acetato celulose (Milipore®, 0,22 μm de poro, 25 mm de diâmetro) e foi feito o plaqueamento do filtrado de cada tempo por meio da técnica de microgotas em superfície adaptada por Hungaro et al. (2013). O cálculo do Burst size foi feito utilizando-se a equação:

$$BS = \frac{\text{Média dos fagos liberados (z)}}{\text{Média do n}^{\circ} \text{ de fagos adsorvidos}}$$

2.2.9. Fatores que afetam os bacteriófagos

2.2.9.1. Viabilidade dos bacteriófagos à luz UV e fluorescente

Para a avaliação da estabilidade dos bacteriófagos a luz, foi utilizada a metodologia descrita por Irriarte et al. (2011). Os bacteriófagos foram expostos à luz UV (lâmpada modelo KII – 108 SCT_{T8-30 W-GER}) a uma distância de 64 cm e luz fluorescente (lâmpada modelo AH: TUB – T10-40 w) a uma distância de 1, 37 m. Os bacteriófagos foram diluídos até a concentração 10^9 PFU.mL⁻¹ e em seguida foram colocados em placas de Petri abertas durante 5, 10, 15 e 20 min sendo expostos a luz UV. Para a exposição dos bacteriófagos a luz fluorescente, estes foram colocados em tubos de ensaio durante 15 e 30 dias. A viabilidade dos bacteriófagos foi determinada, por meio da contagem do número de halos ou placas fágicas em placa contendo a cultura de *P. fluorescens*.

2.2.9.2 Viabilidade dos bacteriófagos a acidez

Para avaliar a estabilidade dos bacteriófagos em relação a acidez, às suspensões de bacteriófagos foram adicionados a alguns ácidos utilizados na indústria de alimentos tais como: ácido acético (Impex) e ácido láctico (Vetec®). Foram utilizadas como base as concentrações destes ácidos descritos como encontrados nos derivados lácteos e o tempo de vida de prateleira dos produtos que contém os ácidos. Em cada suspensão de bacteriófago (concentração 10^9 PFU.mL⁻¹) foi adicionado o ácido acético e o ácido láctico de modo a obter-se a concentração de 1 % e 0,5 % de ácido acético e 0,3 % e 0,2 % do ácido láctico, obtendo-se um volume de 1 mL de solução. A viabilidade dos bacteriófagos foi determinada, por meio da contagem do número de halos ou placas fágicas em cultura plaqueada em ágar após (24, 48 e 72) horas de contato dos bacteriófagos e os ácidos.

2.2.9.3. Viabilidade dos bacteriófagos em soluções sanitizantes e de limpeza na indústria de alimentos.

Foi feito o estudo da viabilidade dos bacteriófagos em soluções sanitizantes, segundo a metodologia descrita por Lopez, (2013). Foi feito o estudo com as soluções sanitizantes mais utilizadas na indústria de alimentos. Em 900 µL de cada solução sanitizante foram adicionados 100 µL de cada bacteriófagos na concentração 10^9 PFU.mL⁻¹. A viabilidade dos bacteriófagos foi determinada, por meio da contagem do número de halos ou placas fágicas em cultura plaqueada em ágar, após contato com a solução sanitizantes nos tempos recomendados por cada fabricante como demonstra a Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Concentração das soluções sanitizantes testadas e o tempo de contato com os bacteriófagos.

Soluções	Tempo de contato (min)	Concentração
Hipoclorito de sódio	15 - 30	0,25 %
Dicloroisocianurato de sódio	15 - 30	200 mg.L ⁻¹
Ácido peracético (NIPPO-LAT 2000)	10	2 %
Desincrustante ácido para inox (NIPPO-LAT, 1000)	15	3 %
Detergente alcalino para lavagem CIP (NIPPO-LAT 300)	40	1,5 – 5 %
Peróxido de hidrogênio (Dinâmica)	15 - 30	60 mg.L ⁻¹
Etanol	15 - 30	70 %
Etanol gel	15 - 30	70 %

2.2.9.4. Viabilidade dos bacteriófagos á salinidade e íons

Para avaliação da estabilidade dos bacteriófagos em diferentes soluções de sais, foi utilizada a metodologia descrita por Mylon et al. (2010). Foram adicionados a 1 mL de suspensão de bacteriófago a 10⁹ PF.mL⁻¹: citrato de sódio (500 mg.L⁻¹), cloreto de sódio (Biosolve, 500 mg.L⁻¹) e cloreto de cálcio (Vetec, 450 mg.L⁻¹). A viabilidade dos bacteriófagos foi determinada, por meio de uma contagem do número de halos ou placas fágicas em cultura plaqueada em ágar, nos tempos 24, 48 e 72 horas de contato.

2.2.9.5. Viabilidade dos bacteriófagos á temperatura

Para a avaliação da estabilidade a diferentes temperaturas, foi utilizada a metodologia descrita por Tey et al. (2009). Suspensões de bacteriófagos foram incubadas a (-20, 10 e 24) °C, durante 30 dias. Foi testada a resistência dos bacteriófagos a pasteurização do leite, lenta (62 °C/ 30 min) e rápida (72 °C/ 15 s). Foi feito o controle da viabilidade dos bacteriófagos pelo plaqueamento pela técnica de microgotas.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1 Isolamento e purificação de bacteriófagos

A presença de bacteriófagos nas suspensões foi observada a partir da visualização de placas de lise sobre a superfície de ágar sobrecamada (TSA) contendo a cultura ativa de *P. fluorescens* conforme a Figura 2.1.

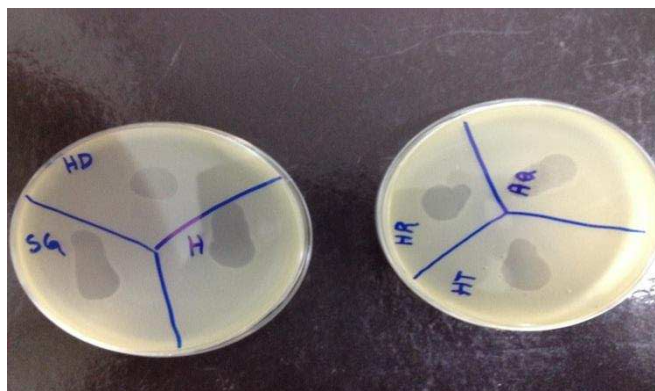


Figura 2.1. Placas de lise dos bacteriófagos isolados em cultura de *P. fluorescens* plaqueada sobre a superfície de ágar sobrecamada (TSA).

Das amostras coletadas, foi possível isolar seis bacteriófagos para *P. fluorescens* da amostra de água residuária dos setores de produção de queijo, doce de leite, manteiga, embalagem de leite e da água do esgoto do laticínio. As amostras de água residuária de laticínio mostraram ser uma boa alternativa para o isolamento de bacteriófagos para *P. fluorescens* NCTC (10038). Correntemente, bacteriófagos podem ser isolados de vários ambientes tais como água, esgoto, fezes, solo entre outros, desde que o hospedeiro esteja presente (KUMARI et al., 2008; BUDZIK, 2000). Após a purificação e propagação, alcançou-se o título de 10^{10} PFU.mL⁻¹.

2.3.2. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados

Os bacteriófagos isolados foram investigados quanto à especificidade de hospedeiros. Não foi observada atividade lítica contra nenhuma outra espécie bacteriana testada, sendo observada especificidade apenas para a *P. fluorescens*. A interação entre os bacteriófagos e seus hospedeiros é mediada por moléculas ligantes compostas por proteínas presentes na estrutura dos bacteriófagos que interagem com receptores presentes na superfície da bactéria hospedeira. Estas interações são responsáveis pela especificidade dos bacteriófagos por uma determinada estirpe ou gênero (RAKHUBA et al., 2010). Os receptores típicos incluem proteínas, lipopolissacarídeos,

carboidratos presentes na membrana externa e estruturas como os flagelos (ROSSI; ALMEIDA, 2010). Em bactérias gram-negativas, a interação é intermediada por meio do lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana e em bactérias gram positivas a interação é realizada pelo peptídeoglicano, ácido tecóico ou lipoteicóico presentes na parede celular do hospedeiro (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

As bactérias lácticas testadas não foram lisadas pelos seis bacteriófagos específicos para *P. fluorescens* NCTC (10038). Este resultado é positivo, uma vez que os laticínios usam culturas lácticas na obtenção de produtos lácteos fermentados e bacteriófagos são um grande problema neste setor (Marco et al., 2012). Desta forma, o fato dos bacteriófagos apresentarem especificidade para *P. fluorescens* significa um fator a mais de segurança quando se avalia a possibilidade de seu uso no controle de micro-organismos deterioradores, pois não comprometem o processo produtivo.

2.3.3 Ensaio de restrição

Na caracterização molecular, as amostras de DNA isoladas dos bacteriófagos foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição tipo I e III (Hind III, Alu I, Hae III, Xho I e EcoR I). Os resultados mostram que o DNA dos bacteriófagos foram digeridos somente pelas enzimas Alu (Sigma Aldrich®) e Hae III (Biolabs®) como mostra a Figura 2.2.

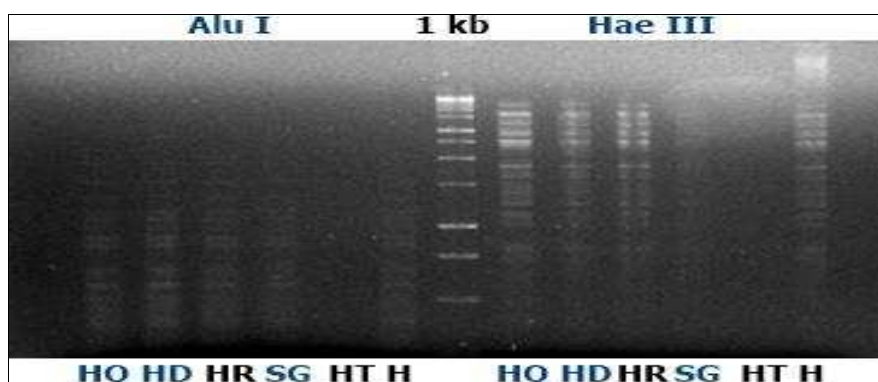


Figura 2.2. Restrição do comprimento do fragmento de polimorfismo (RFLP) da UFV-HQ, UFV- HD, UFV-HR, UFV-SG, UFV-HT e UFV- H

Os resultados sugerem que os bacteriófagos isolados apresentam uma genética similar, contudo, é necessário que seja feito o sequenciamento para conhecerem-se mais profundamente as diferenças entre estes bacteriófagos. Diante dos resultados foram selecionados três bacteriófagos que apresentaram maior título e lises mais transparentes para os estudos subsequentes.

2.3.4. Cinética de adsorção do fago

Utilizou-se para este estudo um inóculo de *P. fluorescens* na concentração 5.6×10^8 UFC.mL⁻¹. A Tabela 2.2 ilustra os resultados do estudo da cinética dos fagos UFV-SG, UFV-HD e UFV-HQ, com base na concentração de cada bacteriófago por minuto após contato com o hospedeiro, considerando um MOI de 0,01.

Tabela 2.2. Fagos de *P. fluorescente* livres em função do tempo de adsorção.

Tempo (min)	Fagos livres (PFU.mL ⁻¹)		
	SG	HD	HQ
1	$3,4 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$
2	$8,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$
3	$4,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$
4	$7,5 \times 10^4$	8×10^4	$7,8 \times 10^4$
5	$3,8 \times 10^4$	4×10^4	$3,7 \times 10^4$
6	$2,4 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
7	$4,8 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
8	$7,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$

A figura 2.3 ilustra o percentual relativo de adsorção de cada bacteriófago após o contato com o hospedeiro nos tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 minutos. Como se pode observar pelo gráfico, após sete minutos de contato já se observa aumento do número de fagos na suspensão o que confirma o início da lise bacteriana. Os dados do sétimo e oitavo minutos foram desconsiderados, pois, o número de bacteriófagos livres aumentou devido a lise das células bacterianas infectadas.

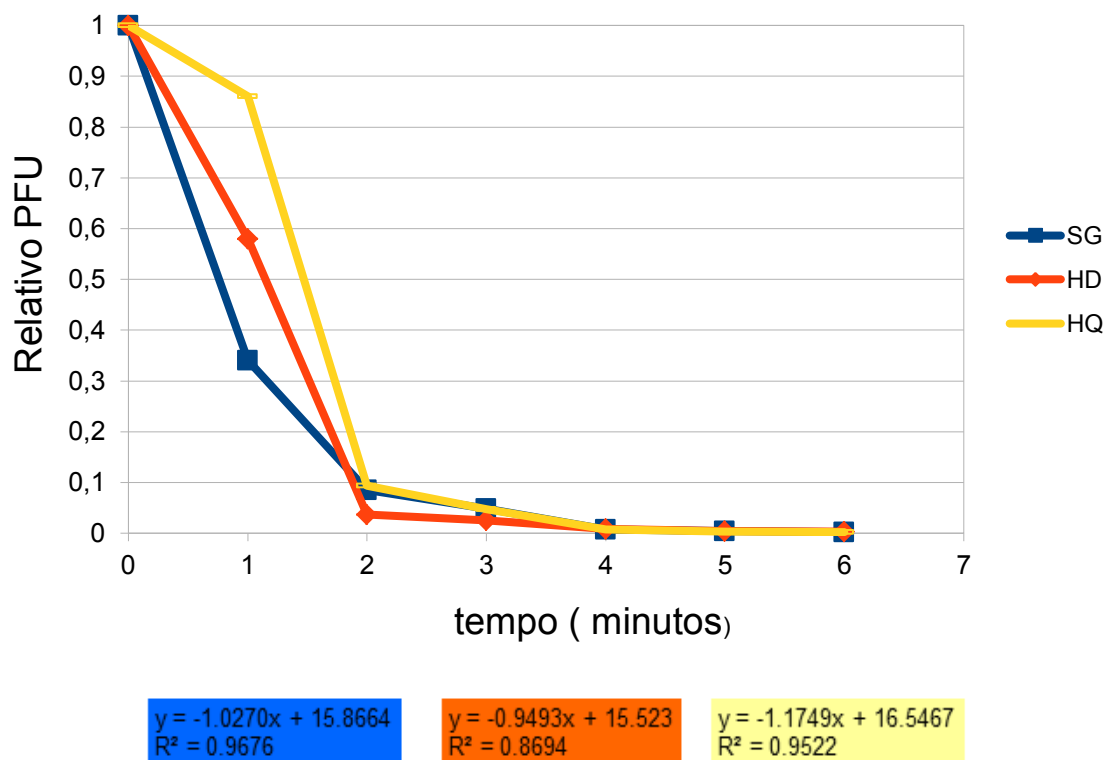


Figura 2.3. Curva de adsorção dos bacteriófagos UFV-SG, UFV-HD, UFV-HQ após contato com o hospedeiro *P. fluorescens*.

Os bacteriófagos UFV-SG, UFV-HD e UFV-HQ apresentaram uma adsorção rápida ao seu hospedeiro durante os primeiros 2 min. Após este tempo, cerca de 90 % dos bacteriófagos estavam adsorvidos. Assim progressivamente o tempo de adsorção diminuiu e o número final de bacteriófagos livres foi inferior a 10 % aos seis minutos de contato. Estes resultados sugerem que os bacteriófagos em estudo, possuem alta capacidade de reconhecimento dos receptores do hospedeiro e consequentemente de infecção. A constante da velocidade de adsorção dos bacteriófagos UFV-SG, UFV-HD e UFV-HQ foi de $1,83 \times 10^{-9}$, $1,7 \times 10^{-9}$ e $2,1 \times 10^{-9}$ mL.min⁻¹ respectivamente.

Os resultados encontrados no experimento, são semelhantes aos resultados encontrados por Sillankorva et al. (2012) quando estudaram a cinética de adsorção do bacteriófago de *P. fluorescens* e constataram que o bacteriófago ϕ BB-PF7A parecia ter duas fases de adsorção: uma adsorção muito rápida durante os primeiros 5 min e seguido por uma taxa mais lenta de

fixação depois de 5 min. O número de bacteriófagos livres foi inferior a 10 % já dentro de 5 min e inferior a 5 % dentro de 15 min após a infecção. A taxa de absorção dos bacteriófagos para o hospedeiro por um período de 5 min foi de $5,58 \times 10^{-10} \text{ mL min}^{-1}$.

2.3.5 Características de crescimento dos bacteriófagos

Neste estudo, constatou-se que os bacteriófagos seguem um crescimento exponencial. Após 20 minutos de infecção, cada bactéria infectada liberou cerca de 212 partículas virais para UFV-HD; 245 para UFV-HQ e 240 para UFV-SG (Figura 2.4). A rápida ação destes bacteriófagos pode ser uma vantagem para o uso no biocontrole de *P. fluorescens* na indústria de alimentos. Estes valores do ciclo de vida de fagos estão em conformidade com os valores encontrados por Sillankorva et al. (2012) que ao estudarem bacteriófagos para *P. fluorescens*, observaram que os períodos de eclipse e latentes do fago ϕ IBB-PF7A foram de 10 e 15 min, respectivamente e uma explosão de 153 PFU por célula infetada após 25 min em temperatura ambiente ($\pm 24^\circ\text{C}$).

Período de latência é um tempo que regula o tempo de geração do fago e o burst size (Abedon et al., 2001). O período de latência (Figura 2.4) foi mais rápido em relação aos períodos de outros bacteriófagos que têm períodos de latência em torno de 21-120 minutos (Lu e Breidt, 2015). Abedon et al., (2001) relataram que as maiores explosões estão associadas com períodos de latência superiores e vice-versa.

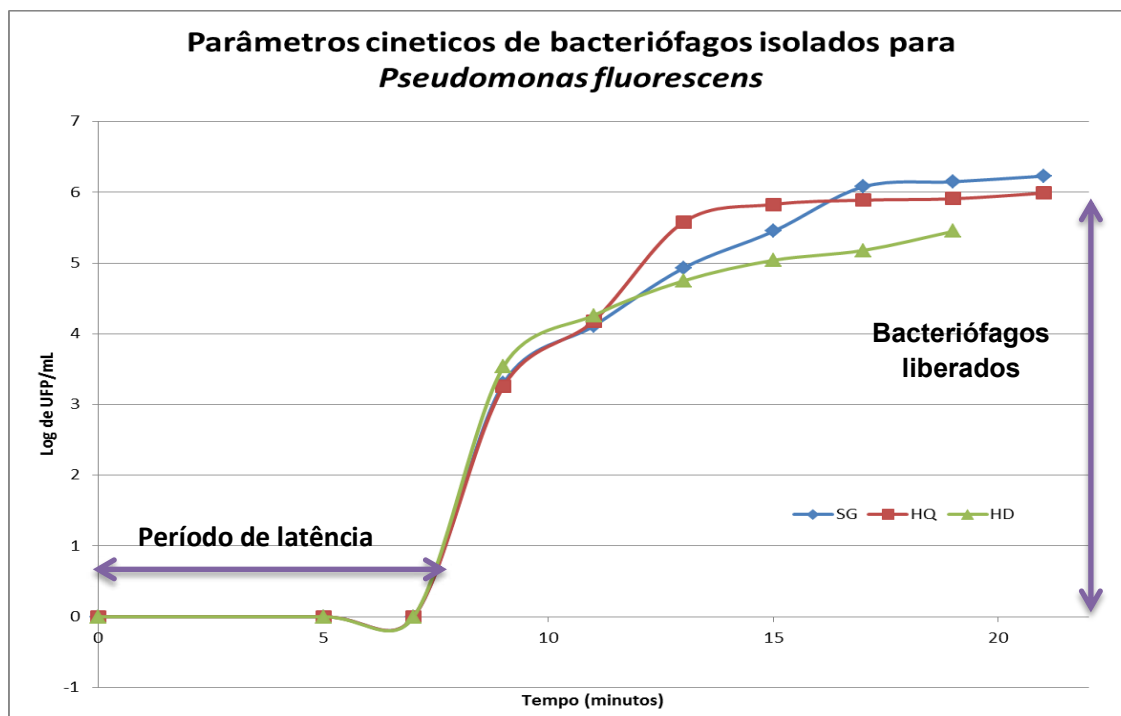


Figura 2.4. Logaritmo de unidades formadoras de placas de lise durante “one-step growth” dos bacteriófagos UFV-SG, UFV-HQ e UFV-HD para *P. fluorescens*.

O tempo de geração de estirpes de *P. fluorescens* é de 52 min a 30 °C (Ludewig et al., 2009), e bacteriófagos específicos para estas células bacterianas devem ter um tempo de replicação mais baixo para evitar a divisão celular antes do final do ciclo lítico. Parâmetros cinéticos, o tamanho da explosão (burst size) e a taxa de adsorção são influenciados pela fisiologia do hospedeiro (Abedon et al., 2001). Por esta razão, os ciclos virais devem acontecer no curto espaço de tempo, quando comparado com o tempo de geração bacteriana, de modo a garantir a eficiência na redução da população microbiana.

2.3.6. Viabilidade dos bacteriófagos á luz, ácidos orgânicos, temperatura e soluções sanitizantes.

O estudo foi realizado usando, em todos os ensaios, bacteriófagos nas seguintes concentrações: **SG**: $1,2 \times 10^9$ PFU.mL⁻¹, **HQ**: $1,1 \times 10^9$ PFU.mL⁻¹ e **HD**: $2,1 \times 10^9$ PFU.mL⁻¹. Todos os bacteriófagos avaliados apresentaram sensibilidade à luz ultravioleta como pode ser observado na Tabela 2.3, tendo

diminuído a concentração em dois ciclos log a cada 5 minutos de exposição. A luz UV pode afetar o material genético do vírus e gerar danos, tais como dímeros de pirimidina (IKEHATA E ONO, 2011) evitando a sua replicação. A maioria dos efeitos inativadores dos bacteriófagos pela luz UV e visível, parece ser devido aos danos acumulados nos ácidos nucleicos. Em sistemas aquáticos, a luz solar (em especial UV-B) parece ser o principal fator no declínio do número de bacteriófagos (SINTON et al., 2002).

Estes bacteriófagos não foram significativamente sensíveis à luz fluorescente, o que é bom para uso na indústria de alimentos, que é amplamente iluminada e excesso de luz não afetou a viabilidade do fago.

Tabela 2.3. Resistência dos bacteriófagos a fatores comuns na indústria de alimentos.

Taxa de perda de viabilidade pela exposição a vários fatores na indústria de alimentos (Log PFU.(min ⁻¹ ou h ⁻¹))	HD	HQ	SG
Luz UV	0,36	0,37	0,33
Luz fluorescente	0,02	0,006	0,013
Ácido láctico 0,3 %	0,00	0,002	0,002
Ácido acético 1,0 %	0,021	0,00	0,021
Dicloroisocianurato de sódio (200 mg.L ⁻¹)	0,02	0,00	0,006
Peróxido hidrogênio (60 mg.L ⁻¹)	0,00	0,00	0,006
Hipochlorito de sódio (0,25 %)	0,006	0,00	0,006
Citrato de sódio (500 mg.L ⁻¹)	0,002	0,002	0,002
Cloreto de sódio (500 mg.L ⁻¹)	0,002	0,002	0,004
Cloreto de cálcio (450 mg.L ⁻¹)	0,002	0,002	0,002

Por outro lado, estes vírus foram resistentes ao ácido láctico e ácido acético, as substâncias usadas na higienização das instalações industriais rotineiramente e a alguns sais, conforme mostrado na Tabela 2.3, sugerindo que as proteínas virais são estáveis nestas condições e a sua viabilidade não é influenciada por estes fatores. Por outro lado, os bacteriófagos perderam viabilidade em presença de álcool a 70 %, álcool gel, ácido peracético, detergente alcalino CIP e desincrustante ácido para aço inoxidável.

Em relação à temperatura, os bacteriófagos de *P. fluorescens* mostraram sensibilidade às temperaturas de (-20, 10 e 24) ° C após estocagem

por 30 dias (Tabela 2.4). Considerando o processo de pasteurização, os bacteriófagos perderam a viabilidade no processo de pasteurização lenta e diminuindo a concentração para $2,6 \text{ Log PFU.mL}^{-1}$ quando submetidos a pasteurização rápida.

O genoma viral é normalmente embalado em um capsídeo de proteína ou glicoproteínas (GELDERBLOM, 1996) e as proteínas podem ser afetadas pela temperatura, ácidos e outros parâmetros. A desnaturação de proteínas do capsídeo ou glicoproteínas pode ser relacionada à perda de viabilidade do bacteriófago após exposição a condições de estresse conforme acima descrito. Segundo Quiberoni et al. (1999), estudos em laticínios demonstraram que o hipoclorito de sódio (100 ppm de cloro livre) e o ácido peracético inativaram bacteriófagos do leite dentro de 5 a 10 min. O uso de etanol a 75 % (v/v) foi efetivo contra bacteriófagos, enquanto o isopropanol não foi tão eficaz. Como os bacteriófagos são em geral mais capazes de resistir às mudanças ambientais do processamento de alimentos que as bactérias, eles podem persistir em locais que não sejam limpos e sanitizados adequadamente (KENNEDY e BITTON, 1987).

Tabela 2.5. Perda de viabilidade do bacteriófago (Log PFU.mL^{-1}) após exposição a diferentes condições (congelamento, refrigeração e pasteurização).

	HD	HQ	SG
Armazenamento a -20°C / 30 dias	$4,32 \pm 0,2$	$4,04 \pm 0,3$	$4,38 \pm 0,2$
Armazenamento a 10°C / 30 dias	$1,02 \pm 0,1$	$0,04 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,3$
Armazenamento a 24°C / 30 dias	$1,02 \pm 0,3$	$0,04 \pm 0,3$	$0,25 \pm 0,1$
Pasteurização (62°C / 30 min)	Inviável	Inviável	Inviável
Pasteurização (72°C / 15 s)	$3,12 \pm 0,2$	$2,24 \pm 0,3$	$2,48 \pm 0,3$

O efeito do estresse térmico sobre os bacteriófagos pode ser variável. A sobrevivência de bacteriófagos termotolerantes ao processo de pasteurização é um importante ponto de entrada para os bacteriófagos em laticínios. O exame de bacteriófagos de *Lactobacillus helveticus* por Quiberoni et al. (1999), revelou que a termotolerância foi dependente do bacteriófago e do meio utilizado, com alguns isolados inativados em temperaturas de pasteurização de (63 a 72°C) e

outros exigindo tratamento a 90 °C. Bacteriófagos isolados a partir de soro de queijo e iogurte requereram aquecimento a 90 °C durante 5 minutos para reduzir a contagem de $(10^6 - 10^7)$ PFU. mL⁻¹ para menos de 10 PFU . mL⁻¹. Binetti et al. (2000). Indústria de alimentos deve ser um lugar com grande quantidade de fatores que podem afetar a viabilidade de bacteriófagos, resultando na diminuição da sua atividade ao longo do hospedeiro. No entanto, estes bacteriófagos podem ser considerados altamente estáveis e podem ser usados para o biocontrole de *P. fluorescens* sob as diferentes condições usadas no processamento de alimentos. Os resultados semelhantes em caracterização dos bacteriófagos, espectro lítico e ao fato de que esses bacteriófagos terem sido isolados no mesmo lugar sugerem que UFV-HD, UFV-HQ e UFV-SG podem ser da mesma espécie.

2.3 Conclusão

Neste estudo foi possível isolar bacteriófagos com potencial para controle biológico de *P. fluorescens* na indústria de laticínios. UFV-HD, UFV-HQ e UFV-SG atingiram cerca de 10^{10} PFU·mL⁻¹ e mostraram ter um curto período de adsorção e explosão indicando alta taxa de replicação. As bactérias lácticas testadas não foram infectadas por esses bacteriófagos, evitando perdas em relação aos produtos lácteos fermentados. Foram identificados alguns detergentes e sanitizantes que podem ser utilizados na descontaminação de superfícies e equipamentos contaminados por *Pseudomonas* e que não afetam os bacteriófagos. A viabilidade durante a pasteurização rápida e resistência a vários fatores presentes na indústria de laticínios sugerem que estes bacteriófagos são uma ferramenta potencial para aumentar a vida de prateleira de leite pasteurizado, devido à deterioração das bactérias proteolíticas.

2.5 Referências bibliográficas

- ABEDON, S. T., HERCHLER, T. D., & STOPAR, D. (2001). **Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability**. Applied and Environmental Microbiology, 67(9), 4233-4241.
- ADAMS, M.H. **Bacteriophages**. New York: Interscience, 450-451, 1959.
- AVSAROGLI, M.D.; BOZOGLU, F.; MUSTAFA, A.M.; BAYINDIRLI, A. **Effect of high pressure on lactococcal bacteriophages**. J Food Saf. 2009; 29:26-36.
- BINETTI, A.G.; REINHEIMER, J.A. **Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants**. J Food Prot. 2000; 63(4):509-15.
- BUDZIK, J.M.. Phage Isolation and Investigation. **Dartmouth Undergraduate Journal of Science**, v. III, n 1, 2000.
- CORRÊA, A. P. F., DAROIT, D. J., Velho, R. V., & BRANDELLI, A. (2011). **Hydrolytic potential of a psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from refrigerated raw milk**. Brazilian Journal of Microbiology, 42(4), 1479-1484.
- COSTA, M.L. **Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 52, (n) 2, 2002.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05/06/2016.
- FIORENTIN, L., VIEIRA, N.D.; BARIONI, W. Jr. **Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers**. Avian Pathology. 34, 258–263. 2005.
- GARDE, S., ÁVILA, M., GAYA, P., ARIAS, R., NUÑEZ, M. **Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of lactate-blowing defect**. International Dairy Journal, 25, 2, 87-91, 2012.
- GELDERBLOM, H. R. (1996). **Structure and classification of viruses**.
- HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. **Bacteriophages as biocontrol agents in food**. J Food Prot. 2005; 68(2):426-37.
- HUNGARO, H.M.; LOPEZ, M.E.S.; ALBINO, L.A.A.; MENDONÇA, R.C.S. **Bacteriophage: the viruses infecting bacteria and their multiple applications**, Reference Module in: Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier, p. 1-12, 2014.
- HUNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S.; GOUVÊA, D.M.; VANETTI, C.D.; PINTO, C.L.O. **Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents**. Food Research International, v. 52, p. 75-81, 2013.
- IKEHATA, H., & ONO, T. (2011). **The mechanisms of UV mutagenesis**. Journal of radiation research, 52(2), 115-125.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Edição. Ed. Artmed. ISBN: 9788536305073. 2005.

KENNEDY, J.E.J.; BITTON, G. **Bacteriophages in foods**. In: Goyal SM, Gerba CP, Bitton G, editors. Phage ecology. New York: John Wiley & Sons; 1987. p.286-316.

KUMARI, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. **Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO Specific bacteriophages isolated from sewage samples**. American Journal Biomedical Sciences, v.1,(2), p.91 – 102, 2009.

KUMARI, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S.. **Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO Specific Bacteriophages Isolated from Sewage Samples**. American Journal Biomedical Sciences, v 1, n. 2, p 91-102, 2009.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE A. **Bacteriophages: Biology and Applications**. CRC Press, 2005, 510 p.

LOPEZ, M.E.S.; **Uso de bacteriófagos para biocontrole de *Escherichia coli* enterohemorrágica**. 2013, 44. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

LU, Z., & BREIDT, F. (2015). ***Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage Φ241 isolated from an industrial cucumber fermentation at high acidity and salinity**. Frontiers in microbiology, 6.

MARCÓ, M. B., MOINEAU, S., & QUIBERONI, A. (2012). **Bacteriophages and dairy fermentations**. *Bacteriophage*, 2(3), 149-158.

MYLON, S.E.; RINCIOG, C.I.; SCHMIDT, N.; GUTIERREZ, L. **Influence of salt and natural organic matter on the stability of bacteriophage MS2**. Langmuir, v. 26, n. 2, p. 1035-1042, 2010.

PAJUNEN, M.; KILJUNEN, S.; SKURNIK, M: **Bacteriophage phi YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O :3, is related to coliphages T3 and T7**. Journal of Bacteriology 2000, 182: 5114-5120.

QUIBERONI, A.; SUAREZ, V.B.; REINHEIMER, J.A. **Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments**. J Food Prot. 1999; 62(8):894-98.

RAKHUBA, D.V.; KOLOMIETS, E.I.; SZWAJECER DEY, E.; NOVIK, G.I. **Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell**. Polish Journal of Microbiology, v. 59, n. 3, p. 145-155, 2010.

ROSSI, L.V.R.; ALMEIDA, R.C.C. **Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 69, p. 151-156, 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Composição e propriedades físico-químicas do leite**. 16f. Curso *on line*- Monitoramento da qualidade do leite. p 1-2. Milkpoint, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Livraria Varela, 4 ed, 632 p, 2010.

SINTON, L.W.; HALL, C.H, LYNCH, P.A, DAVIES-COLLEY, R.J. **Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from water stabilization pond effluent in fresh and saline waters.** Appl Environ Microbiol. 2002; 68(3):1122-31.

WALL, S.K.; ZHANG, J.; ROSTAGNO, M.H.; EBNER, P.D. **Phage therapy reduces transport and lairage-associated Salmonella infections in market weight swine.** Appl Environ Microbiol 2010;76:48–53

CAPITULO 3

USO DE BACTERÍÓFAGOS COMO ALTERNATIVA DE CONSERVAÇÃO DE LEITE CRU E PASTEURIZADO.

RESUMO

A proteólise do leite causada principalmente por *P. fluorescens*, é um problema importante na indústria de laticínios por causa da deterioração do leite cru e pasteurizado refrigerado durante o armazenamento. No presente estudo é feita a descrição do biocontrole de *P. fluorescens* no leite cru e pasteurizado, armazenado a (4, 15 e 24) °C. Comparando-se a contagem de psicrotróficos no mesmo tempo, nos diferentes tratamentos e em diferentes temperaturas nos dois tipos de leite, pode-se observar que a temperatura influenciou de forma significativa ($p < 0,05$). O leite armazenado a 4 °C apresentou contagem de micro-organismos psicrotróficos menor e a ação lítica dos bacteriófagos foi eficaz no controle (leite + bacteriófago) e no tratamento com maior concentração de bacteriófago (10^8 PFU.mL⁻¹). O tempo de armazenamento do leite pasteurizado não teve uma influência significativa ($P < 0,05$) na concentração dos bacteriófagos e a temperatura teve influência significativa ($P < 0,05$) na concentração dos bacteriófagos. Em contrapartida, o tempo e a temperatura de armazenamento do leite cru tiveram influência significativa ($p < 0,05$) na concentração dos bacteriófagos. As temperaturas de (15 e 24) °C apresentaram maior efeito na concentração dos bacteriófagos. Os bacteriófagos não alteraram as características físico-químicas do leite durante o armazenamento e retardaram a ação proteolítica das *P. fluorescens* (NCTC 10038) inoculadas nos tratamentos. Os resultados deste estudo sugerem que o bacteriófago é uma alternativa para o biocontrole de *P. fluorescens* no leite quando aplicado em concentrações elevadas e armazenado a baixas temperaturas.

PALAVRAS CHAVE: Bacteriófagos, biocontrole, leite, pseudomonas fluorescens.

3.1. Introdução

O gênero *Pseudomonas*, considerado o mais importante dentre os psicrotróficos, pode ser encontrado em aproximadamente 10 % da microbiota do leite recém-ordenhado (GUERREIRO et al., 2005). São os micro-organismos de deterioração mais comumente isolados no leite cru e em leite pasteurizado. A maioria destas bactérias (58 – 91 %) tem a capacidade de mostrar distinta ação proteolítica, enzimática, lipolítica e a atividade fosfolipidolítica (WIEDMANN et al., 2000).

Em comparação com outras bactérias psicrotróficas, *Pseudomonas spp.* são caracterizadas por um tempo curto de geração (< 4 h), o que implica que a contaminação com apenas uma única célula microbiana pode levar a números maiores que 10^6 UFC.mL⁻¹ no leite depois das oito dias de armazenamento a temperaturas de 4° C (LANGEVELD e CUPERUS, 1976).

Uso de bacteriófagos específicos para o gênero *pseudomonas* constitui uma alternativa para a conservação de leite, em combinação com a temperatura baixa para impedir ou minimizar estes problemas de deterioração. Os bacteriófagos têm capacidade de se multiplicarem de forma exponencial ao longo do tempo (DIXON, 2004) e não provocam efeitos colaterais, pois, são inofensivos para células de mamíferos (THIEL, 2004). A presença de bacteriófagos em um ambiente industrial pode ser empregada para limitar a propagação de micro-organismos patogênicos, bem como reduzir a contaminação do produto em diferentes fases de produção e processamento (SULAKVELIDZE et al., 2005).

O objetivo desse estudo foi de aplicar os bacteriófagos para o biocontrole de *P. fluorescens* em leite cru e leite pasteurizado, armazenados em temperaturas diferentes (4, 15 e 24) °C. Os dados deste estudo indicam que é possível o biocontrole de *P. fluorescens* no leite usando os bacteriófagos em combinação com temperaturas baixas de armazenamento.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Avaliação do biocontrole

O biocontrole in vitro, foi feito utilizando leite cru e leite pasteurizado a 75 °C/15 s oriundo da Usina de Beneficiamento Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE). Os ensaios foram conduzidos tendo como referência três controles de acordo com a análise realizada: a) leite puro (LC – controle negativo), b) leite + inóculo de bactéria (Lb - 10^4 UFC.mL⁻¹) e c) leite + bacteriófago (LF – 10^8 PFU.mL⁻¹). Foram avaliados dois tratamentos (F) sendo que cada tratamentos consistia na adição ao leite inoculado com a bactéria de uma concentrações específica de bacteriófago (Tabela 3.1). Os tratamentos foram incubados nas temperaturas de 4 °C ± 1 °C; 15 °C ± 1 °C e 24 °C ± 2 °C e analisados durante 0, 3, 6 e 9 dias. Os resultados foram relacionados ao controle Lb (leite + inóculo de bactéria) quando se desejável avaliar a redução da bactéria e frente aos demais controles quando as análises eram físico-químicas.

Tabela 3.1. Esquema empregado no estudo para avaliar a efetividade do uso dos bacteriófagos em leite

Amostra	Tratamento	Inóculo bacteriano (10^4 UFC.mL ⁻¹)	Bacteriófago (PFU.mL ⁻¹)
Leite cru	Lb	+	0
	LF6	+	10^6
	LF8	+	10^8
Leite pasteurizado	Lb	+	0
	LF6	+	10^6
	LF8	+	10^8

(+ com inóculo e – sem inóculo bacteriano)

3.2.2. Contagem de bactérias lácticas (BAL) e *P. fluorescens*

Realizou-se a contagem de BAL e de *P. fluorescens* nos tratamentos ao longo da estocagem. Foram feitas diluições seriadas de aliquotas de 100 µL de cada tratamento em solução salina (0,9 % de NaCl) (Biosolve®). As diluições foram plaqueadas por *spread plat* no meio *Pseudomonas* agar (Himedia®) para a contagem de *P. fluorescens* e por *pour plate* no meio MRS (Difco™) para contagem de BAL.

Para a contagem de bacteriófagos centrifugou-se 1 mL de cada amostra (13000 x g por 10 min), descartou-se o pellet formado e o sobrenadante foi diluído em tampão SM (50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl (Sigma Aldrich®) [pH 7,5], 0,1 mol.L⁻¹ NaCl (Vetec®), 8 mmol.L⁻¹ MgSO₄ (Chemco®).7 H₂O, 0,01 % gelatina (Difco®)) e plaqueado pela técnica de microgotas em superfície usando a metodologia adaptada por Húngaro et al. (2013).

3.2.3. Análises físico-químicas no leite

Com o objetivo de verificar possíveis alterações durante o armazenamento, foram realizadas algumas análises físico-químicas (Densidade, percentual de acidez expresso em ácido láctico, teor de gordura, crioscopia, teste de alizarol (72 % v/v) e pH) do leite nos tempos 0, 3, 6 e 9 dias nos tratamentos armazenados em diferentes temperaturas (4, 15 e 24) °C (AOAC, 2005).

3.2.4. Análise da proteólise

As amostras para análise de proteólise do leite foram preparadas conforme descrito por Adams et al. (1976). Alíquotas de 10 mL do leite refrigerado foram acidificadas para pH 4,0 com ácido clorídrico (Vetec) 10 mol L⁻¹, sob agitação constante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Mikro 200-R) a 12.100 x g por 10 minutos. O soro foi descartado e a caseína precipitada foi estocada a – 20 °C para posterior análise. O volume original foi reconstituído utilizando tampão tris 50 mM pH 9. Foram usados géis de poliacrilamida 15 % contendo SDS (LGC-biotecnologia) para a separação das proteínas, de acordo com Laemmli (1970). Os géis foram polimerizados quimicamente, pela adição de 0,025 % (v/v) de tetrametileno diamina (TEMED) e 0,05 % (p/v) de persulfato de amônio. O tampão de corrida pH 8,6, foi preparado com Tris-base (250mM), glicina (2,5 Mm) e SDS (1%). As amostras foram ajustadas para a concentração de, aproximadamente, 10 mg.mL⁻¹ de proteína (LAEMMLI, 1970; McPHERSON e KITCHEN, 1981). Alíquotas de 20 µL das amostras, correspondentes a, aproximadamente, 20 µg de proteína, foram adicionadas de 10 µL de solução tampão de amostra preparado com Tris/HCl pH 6,8 (100mM), SDS (4,0%) Azul de bromofenol (0,2%), Glicerol (20,0%) e incubadas a 95 °C por cinco minutos e, posteriormente, aplicadas no

gel. A eletroforese foi conduzida a 150 V por 90 minutos, para separação das frações proteicas. Os géis foram corados à temperatura ambiente ($\pm 24\text{ }^{\circ}\text{C}$), em solução de azul brilhante de Coomassie R a 0,2 % em etanol 50 %: ácido acético 12 %: água. Posteriormente, eles foram revelados e transparentizados em solução de etanol 50 % e ácido acético 12 %.

3.2.5. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com cinco tratamentos e três repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se um nível de significância $\alpha=5\%$. O teste Tukey foi utilizado para verificar quais tratamentos diferiam entre si, quando a ANOVA indicou existir diferença significativa.

A análise dos dados foi realizada utilizando o software Minitab17® Statistical Software.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Contagem de *P. fluorescens* e BAL nos tratamentos

Os resultados da média das contagens de *P. fluorescens* no leite cru armazenado nas temperaturas de (4, 15 e 24) °C são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Média das contagens de *P. fluorescens* no leite cru armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 2 e 3) dias.

Tratamento	Temperatura	Média das contagens (log UFC.mL ⁻¹)			Crescimento
		Dias			
		0	2	3	
Lb	4 °C	5,54	--	8,79	3,25
LF6		5,54	--	8,23	2,69
LF8		5,54	--	7,77	2,23
Lb	15 °C	5,11	9,99		4,88
LF6		5,11	8,93		3,82
LF8		5,11	8,85		3,74
Lb	24 °C	4,60	9,53		4,93
LF6		4,60	8,72		4,11
LF8		4,60	8,36		3,76

Inicialmente havia-se planejado realizar a contagem microbiana a cada três dias até uma semana ou 9 dias pois esperava-se um período maior de amostragem para o leite estocado em baixas temperaturas. Da mesma forma, esperava-se uma contagem baixa de deteriorantes no leite, mas observa-se que o inóculo da bactéria usado para os ensaios (10⁴ UFC.mL⁻¹) foi inferior à contagem de pseudomonas no leite cru usado para compor os tratamentos armazenados a (4 e 15) °C. O inóculo escolhido para o estudo serviria para simular um leite com grandes possibilidades de deterioração. Todavia, após o terceiro dia de avaliação para as amostras estocadas a 4 °C o leite já não mais apresentava condições de análise, sendo as mesmas descartadas. Em temperaturas superiores apenas foi possível amostrar até o segundo dia de armazenamento. Pouco se pode inferir das causas exatas desta deterioração,

uma vez que sendo o leite uma matriz muito complexa vários fatores podem ter levado à deterioração do leite em tão curto prazo, inclusive causas microbiológicas.

Comparando o crescimento de *P. fluorescens* nas amostras de leite cru armazenados a (4, 15 e 24) °C pode-se observar que a presença do bacteriófago foi efetivo na inibição do crescimento bacteriano. Em todos os tratamentos adicionados de bacteriófagos a contagem foi mais baixa. Segundo Sulakvelidze et al. (2001), a utilização de altas concentrações de bacteriófagos com multiplicidade de Infecção (MOI) superior a 10.000 é mais eficiente. Multiplicidade de Infecção (MOI) é a relação entre a concentração de bacteriófagos e a concentração do hospedeiro. De acordo com Almeida (2010), vários fatores podem influenciar na capacidade infectiva dos bacteriófagos com o hospedeiro como a proporção de bacteriófagos, quantidade de receptores da célula e a possibilidade do bacteriófago conseguir infectar o hospedeiro.

Um fator importante a ressaltar é que o bacteriófago conseguiu inibir no crescimento bacteriano mesmo em temperaturas mais elevadas. Quando se compara o crescimento da pseudomonas nas diferentes temperaturas, comprova-se o efeito significativo da temperatura no crescimento da bactéria. Observa-se que nos tratamentos adicionados de bacteriófagos este crescimento foi também menor em condição de abuso de temperatura (15 °C) temperaturas de próximas ao ótimo para a bactéria (24 °C) quando comparado ao controle.

As contagens de BAL no leite cru não foram afetadas pela presença do bacteriófago evidenciando a especificidade do bacteriófago para o hospedeiro como pode ser visto na Tabela 3.2.

Uma grande preocupação da indústria de laticínios é a possibilidade de ocorrer infecção dos fermentos lácteos por bacteriófagos na linha de processamento. A proposta de uso de bacteriófagos para biocontrole de deterioradores gera um desconforto para todos os laticínios. Buscar ferramentas, realizar ensaios que demonstrem a especificidade dos bacteriófagos propostos para o biocontrole é tarefa árdua. Os resultados obtidos pra o leite cru sugerem que o bacteriófago em avaliação não ataca as bactérias lácticas durante o armazenamento nas temperaturas estudadas.

Tabela 3.3. Média das contagens diárias de BAL no leite cru armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 2 e 3) dias.

Tratamento	T (°C)	Média das contagens (log UFC.mL ⁻¹)			Crescimento
		dias			
		0	2	3	
Lb	4 °C	4,43		7,13	2,70
LF6		4,43		6,85	2,42
LF8		4,43		6,86	2,42
Lb	15 °C	4,91	9,63		4,72
LF6		4,91	9,62		4,71
LF8		4,91	9,71		4,80
Lb	24 °C	3,89	8,08		4,19
LF6		3,89	8,23		4,34
LF8		3,89	8,26		4,36

Os resultados da contagem de *P. fluorescens* no leite pasteurizado armazenado a diferentes temperaturas podem ser observados na Tabela 3.4.

Mesmo após a pasteurização do leite é possível detectar o psicrotrófico no leite. Isto se pode comprovar ao ver que após adição de 10⁴ UFC. mL⁻¹ de inóculo apenas nas amostras armazenadas a 4 °C a contagem da bactéria estava abaixo de 4,00 log UFC.mL⁻¹.

Comparando-se a contagem de *Pseudomonas* no mesmo tempo, nos diferentes tratamentos e em diferentes temperaturas no leite pasteurizado, pode-se observar que a temperatura influenciou de forma significativa o crescimento bacteriano ($p < 0,05$). O leite armazenado a 4 °C apresentou contagem de micro-organismos psicrotróficos menor ($p < 0,05$) e a ação lítica dos bacteriófagos foi eficaz na inibição do crescimento.

A contagem de micro-organismos psicrotróficos e a temperatura de armazenamento do leite influenciam na produção das proteases, pois, quantidades relativamente altas de proteases são produzidas à temperatura de refrigeração (4°C a 7°C).

Tabela 3.4. Média das contagens de *P. fluorescens* no leite pasteurizado armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 3, 6 e 9) dias

Tratamento	T (°C)	Média das contagens (log UFC.mL ⁻¹)				Incremento
		Dias				
		0	3	6	9	
Lb	4 °C	2,4	6,05	8,56	9,95	7,55
LF6		2,4	5,99	8,49	8,95	6,55
LF8		2,4	5,88	8,2	6,76	4,36
Lb	15 °C	4,48	9,11	9,67		5,19
LF6		4,48	8,36	8,85		4,37
LF8		4,48	8,26	8,98		4,50
Lb	24 °C	4,48	8,88			4,4
LF6		4,48	8,51			4,03
LF8		4,48	8,28			3,80

A contagem de micro-organismos psicrotróficos e a temperatura de armazenamento do leite influenciam na produção das proteases, pois, quantidades relativamente altas de proteases são produzidas à temperatura de refrigeração (4°C a 7°C). Daí a necessidade de se criar alternativas para controle deste deteriorante, seja por uso de baixas temperaturas ou mediante algum fator de biocontrole.

Alguns autores observaram que quando se armazena o leite a 2 °C há inibição da produção de proteases por *Pseudomonas* spp. (COUSIN, 1982; SHAH, 1994). Resultados semelhantes foram encontrados por Izidoro et al. (2013) e Santos et al. (2013), ao armazenarem o leite em diferentes tempos e temperaturas, estes autores verificaram que, independentemente do momento, as contagens foram mais altas, na medida em que se elevou a temperatura de incubação do leite. Pinto (2004) também observou o aumento da população de *P. fluorescens* com o aumento da temperatura de incubação. Haryani et al. (2003) observaram que a temperatura de refrigeração influenciou o crescimento de bactérias psicrotróficas contaminantes naturais em amostras de leite provenientes de duas fontes de produção diferentes de tal forma que o tempo para que a população de psicrotróficos atingisse 10⁷ UFC mL⁻¹ (7 log.mL⁻¹) a 2 °C, 4 °C e 7 °C, foi de nove, sete e quatro dias, respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com os observados neste estudo onde se pode observar que próximo ao sexto de armazenamento a 4 °C as contagens de *P. fluorescens* já ultrapassavam 8 log.mL⁻¹, partindo –se de um inóculo inicial de 4 log.mL⁻¹.

A contagem das BAL foi alta em todos os tratamentos e todas temperaturas, conforme mostrado na Tabela 3.5. Estes resultados corroboram com os resultados da avaliação de especificidade dos bacteriófagos isolados para as BAL descritos no item 2.3.2 do capítulo 2, no qual se observou que os bacteriófagos em estudo não lisaram as bactérias lácticas.

Tabela 3.5. Média das contagens diárias de BAL no leite pasteurizado armazenado a (4, 15 e 24) °C, durante (0, 2 e 3) dias.

Tratamento	T (°C)	Média das contagens (log UFC.mL ⁻¹)				Incremento
		Dias				
		0	3	6	9	
Lb	4 °C	4,48	5,71	7,43	8,55	3,27
LF6		4,48	4,23	5,04	7,83	3,35
LF8		4,48	4,39	5,75	8,05	3,57
Lb	15 °C	4,48	9,38	9,63		4,15
LF6		4,48	8,60	8,92		4,44
LF8		4,48	8,52	8,83		4,35
Lb	24 °C	4,48	9,08			4,60
LF6		4,48	9,26			4,78
LF8		4,48	9,54			5,06

Segundo RAGHU, (2011), a eficácia e a estabilidade dos bacteriófagos estão diretamente relacionadas a aspectos ambientais. Para Jończyk et al. (2011) bacteriófagos podem ser resistentes à fatores físicos e químicos desfavoráveis, tais como oscilações de temperatura, pH, salinidade e íons, podendo assim se estabelecer em ambientes extremos. Whitman e Marshall (1971) observaram que o pH tem influência sobre os bacteriófagos em valores menores ou igual a 5. Sousa (2012) constatou que a temperatura pode influenciar na viabilidade, na ocorrência e na estocagem dos bacteriófagos. Whitman e Marshall (1971) verificaram que a estabilidade de bacteriófagos de

P. fragilis isolados de alimentos refrigerados apresentaram a temperatura de 60 °C como limitante para sua atividade infecciosa, indicando que a temperatura de estocagem exerce influência na atividade do bacteriófago.

3.3.2. Análises físico-químicas no leite

Os resultados das análises físico-químicas dos tratamentos com leite cru durante o períodos de armazenamento a (4 e 15) °C podem ser observados na Tabela 3.7. Para o leite pasteurizado foi observado o mesmo comportamento.

Tabela 3.7. Características físico-químicas do leite cru estocado a (4 e 15)°C durante o armazenamento.

T	Parâmetro	Leite cru									
		Tempo									
		0					9				
		L	Lf	Lb	LF6	LF8	L	Lf	Lb	LF6	LF8
4 °C	Densidade	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030					
	Crioscopia	0.544	0.544	0.544	0.544	0.544	0.544	0.544	0.544	0.544	0.544
	Acidez	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.18	0.15
	Gordura	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	pH	6.66	6.66	6.66	6.66	6.66	6.60	6.60	6.41	6.52	6.45
15 °C	Densidade	1,033	1,033	1,033	1,033	1,033					
	Crioscopia	0,542	0,542	0,542	0,542	0,542	0,550	0,550	0,550	0,550	0,550
	Acidez	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
	Gordura	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
	pH	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,57	6,57	6,57	6,57	6,57

Onde densidade (g/mL); Crioscopia (°C); acidez (%); gordura (% m/m) e os tratamentos: L – leite puro, Lf - leite adicionado de bacteriófago (10^8 PFU/mL⁻¹), Lb – leite adicionado de *Pseudomonas* (10^4 UFC/mL⁻¹), LF6 - leite adicionado de *Pseudomonas* e de bacteriófago (10^6 PFU/mL⁻¹) e LF8 - - leite adicionado de *Pseudomonas* e de bacteriófago (10^8 PFU/mL⁻¹).

Os resultados mostraram que após o armazenamento tanto no leite cru quanto no leite pasteurizado (dados não tabulados) não houve alteração evidente das características físico químicas do leite comprovando assim que a adição de bacteriófagos não altera as características desta matéria prima. Alguma pequena variação observada pode ser devido a erros de análise, a característica da própria matéria prima, à amostragem entre outros fatores.

Os testes de alizarol realizados em todos os tratamentos mostram o mesmo perfil de resultados, indicando que a adição de bacteriófagos ao leite não afeta a matéria prima.

As técnicas para controle de bactérias patogênicas não devem alterar as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos. Elas devem ser seguras, de baixo custo e aceitas pela população. Atualmente, nenhuma técnica atende a todos esses critérios, embora uma ampla gama de metodologias tenha sido proposta para o controle de patógenos e micro-organismos deterioradores em alimentos. Estratégias de intervenção focalizando o início da cadeia produtiva têm sido usadas, entretanto essas medidas são caras e difíceis de serem mantidas. Notou-se alteração da acidez do leite durante o armazenamento (de 0,16 a 0,18 g de ácido láctico), mesmo assim, o leite ainda está de acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o qual exige que a acidez do leite deve estar entre 0,14 e 0,18g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite (BRASIL, 2011). Esse aumento da acidez durante o armazenamento sob resfriamento também foi reportado por Avelar (2015). Ao armazenar o leite a 4, 7 e 10 °C durante 3 dias, este autor verificou aumento da acidez de 0,156 g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite para 0,16g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite.

3.3.3. Análise da proteólise

As frações das proteínas no tratamento controle (CB+) contendo apenas as bactérias *P. fluorescens* apresentaram-se mais fracas ao longo dos dias comparando com as frações dos outros tratamentos. No entanto, quando o inóculo de bactérias foi inoculado com o bacteriófago, uma diminuição no grau de degradação das diferentes frações de proteína foi observada quando comparado ao tratamento controle (CB+). No tratamento controle (CF), notou-se uma diminuição no grau de degradação das diferentes frações de proteínas foi observada quando

comparado ao tratamento controle (C-) e os demais tratamentos (Figura 3.1). Os resultados sugerem que os bacteriófagos utilizados retardaram a ação proteolítica das *P. fluorescens* (NCTC 10038) inoculadas nos tratamentos. A ocorrência de proteólise pela atividade de proteases nativas termoestáveis é relacionada, principalmente, com a atividade de plasmina, uma serina protease e seu precursor inativo, o plasminogênio (BASTIAN; BROWN, 1996; HUMBERT et al., 1982).

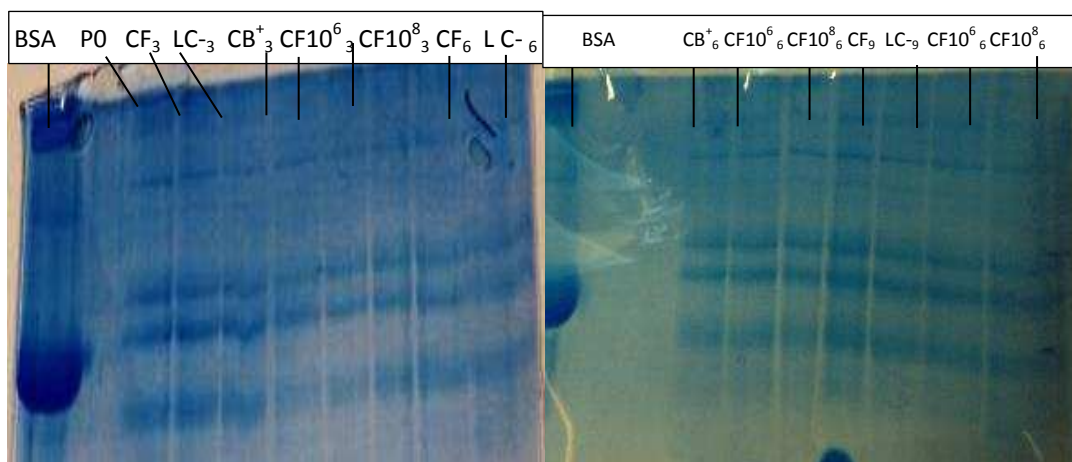


Figura 3.1. Análise da proteólise no leite pasteurizado tratado e armazenado a 4 °C, durante nove dias, sendo: BSA (albumina de soro bovino), LC- (leite), CB⁺ (leite + inóculo), CF (leite + bacteriófago), F10⁶ (leite + inóculo + bacteriófago) e F10⁸ (leite + inóculo + bacteriófago).

3.4. Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que os bacteriófagos é uma alternativa para o biocontrole de *P. fluorescens* no leite quando adicionado em concentrações elevadas e armazenado a temperaturas baixas. Observou-se que os bacteriófagos não alteraram as características físico-químicas do leite, os componentes do leite não influenciaram na atividade lítica dos bacteriófagos e estes retardaram a ação proteolítica das *P. fluorescens*.

3.5. Referências bibliográficas

- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. **Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment.** Journal of Dairy Science, v. 59, p. 823-827, 1976.
- AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official method of analysis.** 18th ed. Washington, 2005. 82 p.
- ARNAUL-ROLLIER, I.; VAUTERIN, L.; DE VOS P.; MASSART, D.L.; DEVRIESE, L.A, DE ZUTTER. **A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat.** Journal of Applied Microbiology 1999, 87: 15-28.
- BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. **Plasmin in milk and dairy products: un update.** International Dairy Journal, Barking, v. 6, n. 5, p. 435-437, May 1996.
- BASTOS, R.A. **Influência do armazenamento e da contagem de bactérias psicrótróficas do leite nas características do queijo prato durante a maturação.** 2014. 210 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 6-11. 2011.
- COUSIN, M. A. **Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review.** Journal of Food Protection, Iowa, v. 45, p. 172-207, 1982.
- DIXON, B. **New dawn for phage therapy.** The Lancet infectious diseases 4:186. 2004
- HARYANI, S. ; Datta, N; Elliott, A.J; Deeth, H.C.; **Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature.** Australian Journal of Dairy Technology, Werribee, v. 58, n. 1, p. 15-20, 2003.
- HUMBERT, G; BRUN-BELLUT, T.M; ALAIS, C. **Proteinase activity in bovine raw milk.** Journal of Dairy Science, Champaign, v. 66, p. 2271-2277, 1983.
- IZIDORO, T. B. et al. **Atividade proteolítica de bactérias psicrótróficas em leites estocados em diferentes temperaturas.** Revista Ceres, Viçosa, MG, v. 60, n. 4,p. 200, 2013.
- JOŃCZYK, E.; KŁAK, M.; MIĘDZYBRODZKI, R.; GÓRSKI, A. **The influence of external factors on bacteriophages - review.** Folia Microbiologica (Praha), v. 56,n.3, p.191 200, 2001. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3131515/>. Acesso em 01/01/2016.452-457, jul./ago. 2013.
- KIRSCH, R.H, BERRY, F.E, BALDWIN, C.L, FOSTER, E.M: **The Bacteriology of Refrigerated Ground Beef.** Food Research 1952, 17: 495-503.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v. 227, p. 680-684, 1970.
- McPHERSON, A.V.; KITCHEN, B.J. **The proteins and lipids of the aqueous phase of butter.** The Australian Journal of Dairy Techonology, n. 1, p. 17- 20, 1981.

- MOLIN G.; TERNSTROM, A: **Numerical Taxonomy of Psychrotrophic *Pseudomonas***. Journal of General Microbiology 1982, 128: 1249-1264.
- MOLIN, G.; TERNESTROM, A: **Phenotypically Based Taxonomy of Psychrotrophic *Pseudomonas* Isolated from Spoiled Meat, Water, and Soil**. International Journal of Systematic Bacteriology 1986, 36: 257-274.
- NÖRNBERG, M. F. B.; FRIEDRICH, R.C.; WEISS,R.D.N.; EDUARDO C TONDO, E.C. **Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk**. International Journal of Dairy Technology, Reino Unido, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2009.
- Ogier, J.C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; LACROIX-BUCHET, A: **Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis**. Applied and Environmental Microbiology 2002, 68: 3691-3701.
- PINTO, C.L.O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado á produção do leite UHT**. 2004. 97 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- RAYA, R.P.; VAREY, R.A; OOT, M.R.; DYEN, T.R.; CALLAWAY, T.S.; EDRINGTON, E.M.; KUTTER, A.D.; BRABBAN. 2006. **Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep**. Applied and environmental microbiology 72:6405-10.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Bactérias psicrotróficas e a qualidade do leite**. Revista CBQL, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 12-15, 2003a.
- SHAH, N. P. **Psychrotrophs in milk**: a review. Milchwissenschaft, Munchen, v. 49, n. 8, p. 432-437, July 1994.
- SULAKVELIDZE, A.; BARROW, P. **Phage therapy in animals and agribusiness**. In: Kutter, E.; Sulakvelidze, A. Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton: CRC Press, p. 335-380, 2005.
- THIEL, K. 2004. **Old dogma, new tricks 21st Century phage therapy**. Nature biotechnology 22:31-6.
- WAGENAAR, J.A.; VAN BERGEN, M.A.; MUELER, T.M.; WASSENAAR, R.M. CARLTON. 2005. **Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers**. Veterinary microbiology 109:275-83.
- WHITMAN, P.A.; MARSHALL, R.T. **Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef**. Applied Microbiology, v. 22, p. 463 – 468, 1971.
- YAO, J.D.C., MOELLERING Jr, R.C. 1995. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D. C. Antimicrobial agents, pp. 1474-1504. In P.R. Murray (ed.),

4. CONCLUSÃO GERAL

Os bacteriófagos isolados neste trabalho têm várias características atraentes, como tempos de replicação muito curtos, capacidade de adsorção muito rápida, resistência a vários fatores que possam ser encontrados no alimento, nos ambientes de processamento e armazenamento, o que torna o bacteriófago um candidato promissor para fins terapêuticos, profiláticos ou de saneamento. A tecnologia deveria ser transferida para o campo para avaliar o potencial do biocontrole com bacteriófago em bactérias contaminantes naturais em condições práticas de produção de alimentos, processamento e armazenamento. De todos os fatores com potencial para limitar a eficácia do controle de bactérias através dos bacteriófagos, a preocupação mais significativa é a gama restrita de hospedeiros em relação à diversidade de bactérias susceptíveis que habitam os alimentos. Uma abordagem mais gratificante e prática seria gerar bacteriófagos com uma gama mais extensa de hospedeiros e, em seguida, montar um “pool” de bacteriófagos com atividades complementares. Além do mais, os bacteriófagos também poderiam ser usados como um componente adicional, onde eles poderiam agir sinergicamente quando aplicados com um agente antimicrobiano compatível, como por exemplo, uma bacteriocina. Espera-se que o bacteriófago seja adicionado nos alimentos como mais uma teoria de barreiras.