

MICHELLE SILVA RAMOS

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS PARA
BIOCONTROLE DE *Pseudomonas* spp. EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

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
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R175i
2013

Ramos, Michelle Silva, 1981-

Isolamento e caracterização de bacteriófagos para
biocontrole de *Pseudomonas* spp. em queijo Minas Frescal /
Michelle Silva Ramos. – Viçosa, MG, 2013.
xiv, 69 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 58-67

1. Queijo. 2. Bacteriófagos. 3. *Pseudomonas*. 4. Vírus.
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. 636.1277

MICHELLE SILVA RAMOS

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍÓFAGOS PARA
BIOCONTROLE DE *Pseudomonas* spp. EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

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: 22 de março de 2013.

Wilmer Edgard Luera Peña
(Coorientador)

Edimar Aparecida Filomeno Fontes
(Coorientadora)

Luciana Rodrigues da Cunha

Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

Aos meus pais,
pelo apoio, amor e princípios morais.
que formaram os alicerces da minha história de vida.

DEDICO

*"O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes."*

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Deus, por essa grande conquista e por me guiar nos momentos mais difíceis.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

À professora Regina Célia Santos Mendonça pela orientação, oportunidade e confiança.

À professora Edimar Aparecida Filomeno Fontes, pela coorientação, amizade, paciência, apoio, auxílio na fabricação dos queijos e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Wilmer Edgard Luera Peña, pela coorientação e disposição em dividir seus conhecimentos contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

À professora Luciana pela disponibilidade, sugestões e participação na banca examinadora.

Aos demais professores que contribuíram na minha formação transmitindo os seus conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV), por estarem sempre dispostos a ajudar e em especial ao Oswaldo, pela pasteurização do leite para a fabricação dos queijos.

Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar a visualização microscópica dos bacteriófagos.

Ao Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos/UFV e ao Laboratório de Frutas e Hortaliças/UFV pelo uso dos equipamentos.

Aos meus pais, Afrânio Cléber Ramos e Emília Fernandes da Silva Ramos e ao meu irmão Michel Silva Ramos pelo apoio, amor, incentivo e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), Humberto, Luiz Augusto, Arthur, Delaine, Marjorie pela amizade e apoio e em especial à Márcia que durante todo o momento me

auxiliou na execução deste experimento com muita paciência e boa vontade e por dividir comigo as preocupações e conhecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Tratamento de Resíduos, Maria Paulina, Gerson e Marcos pela amizade e ajuda durante o estágio de ensino.

Aos meus estagiários, Marcela, Daniel, Maíra e Érica e aos estudantes de iniciação científica, Eyder, Laís e Mariana pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus amigos João Paulo de Sá, Marcelle Rodrigues e Juliana Giovannini pela amizade, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis durante o meu mestrado.

Às minhas amigas da república Relaxa aê, Jéssica, Flávia e Arianne e da república Taberneira, Joashlenny, Suellen e Camila pela amizade, companheirismo e momentos de descontração.

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

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Michelle Silva Ramos, filha de Afrânio Cléber Ramos e Emília Fernandes da Silva Ramos, nasceu no Rio de Janeiro, no dia 13 de novembro de 1981.

Em julho de 2009, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em novembro de 2012, especializou-se em Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Ouro Preto, em Ouro Preto, Minas Gerais.

Em março de 2011, ingressou no curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de dissertação no dia 22 de março de 2013.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Produção e consumo de queijo Minas Frescal no Brasil.....	4
3.2. O queijo Minas Frescal.....	5
3.3. Micro-organismos psicrotróficos e a vida de prateleira de produtos lácteos.....	9
3.4. Gênero <i>Pseudomonas</i>	11
4. Bacteriófagos.....	13
4.1. Definição, caracterização e aplicações.....	13
4.2. Utilização de bacteriófagos como biocontrole em alimentos.....	16
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5.1. Micro-organismos.....	18
5.1.2 Micro-organismos utilizados na avaliação de especificidade.....	18
5.1.3. Coleta de amostras para isolamento de bacteriófagos.....	19
5.2. Isolamento de <i>Pseudomonas</i> spp. de queijos Minas Frescal do comércio varejista.....	19
5.2.1. Caracterização bioquímica e molecular dos isolados.....	19
5.2.2. Extração e purificação do DNA.....	21
5.2.3. Amplificação do fragmento na região 16S.....	21
5.3. Isolamento de bacteriófagos.....	22
5.3.1. Isolamento de bacteriófagos de água residuária.....	22
5.3.2. Isolamento de bacteriófagos de exsudado de frangos congelados.....	23

5.3.3. Purificação dos bacteriófagos.....	23
5.3.4. Seleção de bacteriófagos.....	24
5.3.5. Propagação de bacteriófagos.....	24
5.3.6. Titulação e estoque de bacteriófagos.....	24
5.3.7. Análise da morfologia de bacteriófagos.....	25
5.3.8. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos seleccionados.....	25
5.3.9. Diversidade genética entre os isolados pelo perfil de polimorfismo.....	26
5.3.10. Extração do DNA.....	26
5.3.11. Ensaio de restrição.....	27
6. Elaboração dos queijos Minas Frescal.....	27
6.1. Delineamento experimental.....	27
6.2. Análises microbiológicas dos queijos elaborados.....	28
6.2.1. Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp.....	30
6.2.2. Avaliação de micro-organismos proteolíticos.....	30
6.2.3. Avaliação da atividade dos bacteriófagos.....	31
6.3. Análises físico-químicas dos queijos elaborados.....	31
6.3.1. Quantificação do teor de sal.....	31
6.3.2. Medida de pH e pesagem dos queijos.....	32
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
7.1. Caracterização das estirpes bacterianas isoladas de queijos Minas Frescal do comércio varejista.....	33
7.1.1. Caracterização bioquímica.....	33
7.1.2. Caracterização molecular.....	36
7.2. Isolamento e purificação de bacteriófagos.....	38
7.2.1. Análise morfológica de bacteriófagos.....	39
7.2.2. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos seleccionados.....	41
7.2.3. Ensaio de restrição.....	44
8. Avaliação microbiológica dos queijos elaborados.....	46
9. Avaliação físico-química dos queijos elaborados.....	53
10. CONCLUSÃO.....	56

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de morfologia de bacteriófagos.....	14
Figura 2. Ciclo lítico e lisogênico de bacteriófagos.....	15
Figura 3. Exemplos da aplicação de bacteriófagos ao longo da cadeia alimentar.....	17
Figura 4. Fluxograma das etapas de fabricação do queijo Minas Frescal.....	29
Figura 5. Queijo Minas Frescal após a fabricação.....	30
Figura 6. Produto de amplificação do gene 16S rDNA de <i>Pseudomonas</i> spp. através da técnica de PCR. Controle positivo.....	37
Figura 7. Identificação molecular de isolados bacterianos de queijos Minas Frescal do comércio varejista.....	37
Figura 8. Placas de lise dos bacteriófagos isolados.....	38
Figura 9. Observação microscópica do bacteriófago de <i>P. fluorescens</i> (ATCC 13525), obtidos de água residuária de laticínios em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140.000 x em 100 nm.....	39
Figura 10. Observação microscópica do bacteriófago de <i>P. fluorescens</i> (ATCC 13525), obtido de exsudado de frango congelado em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140.000 x em 100 nm.....	40
Figura 11. Identificação molecular dos bacteriófagos F9 e F10 pelo perfil de polimorfismo (enzima <i>Hae</i> III). Linha 1 bacteriófago isolado de exsudado de frangos congelados. Linha 2 bacteriófago isolado de água residuária de laticínios. Linha 3 marcador de peso molecular 1 kb.....	45
Figura 12. Identificação molecular dos bacteriófagos F9 e F10 pelo perfil de polimorfismo (enzima <i>Hinf</i> I). Linha 1 bacteriófago isolado de exsudado de frangos congelados. Linha 2 bacteriófago isolado de água residuária de laticínios. Linha 3 marcador de peso molecular 1 kb.....	45
Figura 13. Variação da contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. (Log UFC g ⁻¹) nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	48
Figura 14. Variação da contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. (Log UFC mL ⁻¹) no exsudado dos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	48
Figura 15. Variação da contagem de micro-organismos proteolíticos (Log UFC mL ⁻¹) nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	49

Figura 16. Variação da contagem de micro-organismos proteolíticos (Log UFC mL ⁻¹) no exsudado dos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	50
Figura 17. Variação da contagem de bacteriófagos (Log UFC g ⁻¹) nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	51
Figura 18. Variação da contagem de bacteriófagos (Log UFC mL ⁻¹) no exsudado dos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	52
Figura 19. Média dos valores de pH nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	53
Figura 20. Média dos valores de porcentagem de cloretos nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	54
Figura 21. Média dos valores de porcentagem de massa nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição média do queijo Minas Frescal.....	6
Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos utilizada para amplificação do fragmento na região 16S.....	21
Tabela 3. Resultados dos testes bioquímicos realizados com as estirpes bacterianas isoladas de queijos Minas Frescal adquiridos no comércio varejista.....	34
Tabela 4. Valores dos tamanhos de pares de base de cada estirpe bacteriana confirmada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	36
Tabela 5. Teste de especificidade com as estirpes isoladas de queijos Minas Frescal adquiridos no comércio varejista.....	41
Tabela 6. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos F9 e F10 em relação a outros gêneros e espécies de micro-organismos.....	43
Tabela 7. Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp. expresso em log UFC mL ⁻¹ no leite e no soro durante a fabricação de queijo Minas Frescal.....	46
Tabela 8. Valores médios da contagem de <i>Pseudomonas</i> , proteolíticos e bacteriófagos em queijos Minas Frescal e no exsudado estocados por 21 dias sob refrigeração (10 °C).....	49
Tabela 9. Valores médios do pH, cloretos e perda de massa em amostras de queijos estocados por 21 dias.....	53
Tabela 1A. Resumo da análise de variância para contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. e proteolíticos em amostras de queijos estocados por 21 dias.....	68
Tabela 2A. Resumo da análise de variância para contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. e proteolíticos em amostras de exsudado dos queijos estocados por 21 dias.....	68
Tabela 3A. Resumo da análise de variância para contagem de bacteriófagos em amostras de queijos estocados por 21 dias.....	68
Tabela 4A. Resumo da análise de variância para pH, cloretos e perda de massa em amostras de queijos estocados por 21 dias.....	69

RESUMO

RAMOS, Michelle Silva, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Isolamento e caracterização de bacteriófagos para biocontrole de *Pseudomonas* spp. em queijo Minas Frescal.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Edimar Aparecida Filomeno Fontes e Wilmer Edgard Luera Peña.

O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e utilizar bacteriófagos líticos no biocontrole de *Pseudomonas* spp. em queijos Minas Frescal. Foram isolados e caracterizados bacteriófagos obtidos de água residuária de laticínios e de exsudado de frangos congelados. Após propagação, os bacteriófagos alcançaram contagens entre 10^{-10} e 10^{-11} UFP. mL⁻¹ e foram avaliados quanto à especificidade para a distintos gêneros e espécies de estirpes microbianas e em relação às estirpes bacterianas isoladas de queijo Minas Frescal obtidos no comércio varejista de Viçosa e região de diferentes épocas e produtores. Foram caracterizados quanto à morfologia e diversidade genética. Os bacteriófagos apresentaram baixo espectro de ação entre gêneros diferentes de bactérias e amplo espectro entre espécies diferentes do mesmo gênero. Quanto a atividade lítica dos bacteriófagos às estirpes bacterianas isoladas de queijos Minas Frescal do comércio varejista, o bacteriófago isolado de exsudado de frango apresentou especificidade contra um maior número de estirpes em comparação ao bacteriófago isolado de água residuária de laticínios. Os dois bacteriófagos não demonstraram diferenças no perfil genômico, exibiram morfologias semelhantes, apresentando cabeça icosaédrica e caudas curtas, o que indica serem da família *Podoviridae* e ordem Caudovirales. Através de testes bioquímicos e técnica de PCR foram realizadas a identificação e confirmação das estirpes bacterianas isoladas de queijo Minas Frescal do comércio varejista, demonstrando maioria na identificação pertencente ao gênero *Pseudomonas* spp. Foram fabricados queijos Minas Frescal em condições laboratoriais afim de verificar a eficiência do uso conjunto dos bacteriófagos nas concentrações 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} PFU. mL⁻¹ no biocontrole de micro-organismos deterioradores. Os parâmetros microbiológicos avaliados incluíram contagens de *Pseudomonas* spp., micro-organismos proteolíticos, bacteriófagos no leite, no soro, nos queijos e no exsudado dos queijos e os físico-químicos foram pH, porcentagem de cloretos e perda de massa durante 21 dias sob refrigeração. Observou-se nesta avaliação o efeito do

uso em conjunto de bacteriófagos sobre a contagem de *Pseudomonas* spp e micro-organismos proteolíticos em queijos Minas Frescal mostrando dependência na concentração utilizada. As maiores reduções nas contagens de *Pseudomonas* spp e micro-organismos proteolíticos foram observadas na concentração 10^{-4} PFU. mL⁻¹. Já as concentrações de bacteriófagos 10^{-6} e 10^{-8} PFU mL⁻¹ não demonstraram efeito no controle da multiplicação destes micro-organismos durante o tempo de estocagem. Resultados semelhantes foram observados quando avaliado a contagem de micro-organismos proteolíticos, ao qual a concentração de bacteriófagos 10^{-4} PFU mL⁻¹ demonstrou maior eficiência na inibição da multiplicação destes micro-organismos. Foi verificado um decréscimo na contagem de bacteriófagos, porém, a presença destes nos queijos continuaram durante o tempo de estocagem. Não houve variação significativa em relação ao pH, massa dos queijos e percentagem de cloretos durante o período de estocagem. Dessa forma, conclui-se que o uso conjunto de bacteriófagos líticos isolados de diferentes ambientes apresentam potencial de utilização no biocontrole de *Pseudomonas* spp. em queijos Minas Frescal.

ABSTRACT

RAMOS, Michelle Silva, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, March 2013. **Isolation and characterization of bacteriophages for biocontrol of *Pseudomonas* spp. in Frescal Minas cheese.** Advisor: Regina Celia Santos Mendonça. Co-Advisors: Edimar Aparecida Filomeno Sources and Wilmer Edgard Luera Peña.

The aim of this study was to isolate, characterize and use the lytic bacteriophages in biocontrol *Pseudomonas* spp. in Minas Frescal cheese. Bacteriophages obtained from dairy wastewater and exudate of frozen chickens were isolated and characterized bacteriophages obtained from dairy wastewater and exudate of frozen chickens. After propagation, bacteriophages achieved counting between 10^{-10} and 10^{-11} PFU. mL⁻¹ and were evaluated for specificity to different genera and species of microbial strains and in relation to bacterial strains isolated from Minas Frescal cheese obtained in retail stores in Viçosa region and from different periods and producers. They were then characterized for the morphology and genetic diversity. Bacteriophages presented a low spectrum of action between different genera of bacteria and wide spectrum of different species of the same genus. As to the lytic activity of the bacteriophage to the bacterial strains isolated from cheese Minas Frescal retail, the bacteriophage isolated of exudate chicken showed specificity against a larger number of strains in comparison to the bacteriophage isolated from dairy wastewater. The two bacteriophages showed no differences in genomic profiling, these exhibited similar morphologies, with icosahedral heads and short tails, indicating that they belong to the family *Podoviridae* and order Caudovirales. Through biochemical tests and PCR were performed and confirmed the identification of bacterial strains isolated from Minas Frescal cheese retail, demonstrating majority in the identification of the genus *Pseudomonas* spp. Frescal Minas cheeses were manufactured under laboratory conditions in order to verify the efficiency of the combined use of bacteriophages at concentrations 10^{-4} , 10^{-6} and 10^{-8} PFU. mL⁻¹ in the biocontrol of deteriorative microorganisms. The microbiological parameters have included counts of *Pseudomonas* spp. Proteolytic micro-organisms, bacteriophages in milk, whey, cheese and the in the exudate of the cheeses and the physicochemical were pH, chlorides and percentage of weight loss during 21 days under refrigeration. It was

noted in this review that the effect of the combined use of bacteriophages on the count of *Pseudomonas* spp and proteolytic micro-organisms in Minas cheese Frescal showing dependence on concentration used. The largest reductions in the counts of *Pseudomonas* spp and proteolytic micro-organisms were observed in the concentration 10^{-4} PFU. mL⁻¹. As for the concentrations of 10^{-6} and 10^{-8} PFU. mL⁻¹ bacteriophages. showed no effect in controlling the growth of these micro-organisms during storage period. Similar results were observed when measured count proteolytic microorganisms to which the bacteriophage concentration of 10^{-4} PFU mL⁻¹ showed a higher efficiency in inhibiting the proliferation of these micro-organisms. It was observed a decrease in the count of bacteriophages, however, the presence of the cheeses continued during the storage time. No significant changes in relation to pH, mass of cheeses and percentage of chlorides during the storage period. Thus, it is concluded that the combined use of lytic bacteriophages isolated from different environments have potential use in the biocontrol of *Pseudomonas* spp. in Minas Frescal.

1. INTRODUÇÃO

O suprimento de produtos lácteos com maior vida de prateleira e livre de micro-organismos patogênicos é cada vez mais desejável tanto para a indústria quanto para o consumidor, assim como a adequação das características físico-químicas, sensoriais, nutritivas e microbiológicas. No entanto, esses alimentos quando processados em condições higiênico-sanitárias inadequadas ou expostos a condições ambientais irregulares, alterações na qualidade podem ocorrer e desencadear uma série de modificações prejudicando as características intrínsecas do produto.

O queijo Minas Frescal é um dos queijos mais populares no Brasil, porém, por ser um produto fresco, é extremamente vulnerável à deterioração microbiana e alterações bioquímicas, devido ao baixo teor de sal e alto teor de água na sua composição. O seu armazenamento deve ser feito sob condições de refrigeração. O leite como matéria prima na elaboração de queijos, deve ser de boa procedência e de baixa contaminação microbiana de forma a garantir a qualidade do produto.

Os principais micro-organismos envolvidos na deterioração de alimentos refrigerados são os psicotróficos como as bactérias do gênero *Pseudomonas*. Devido a falhas durante o processamento e pós-processamento, um elevado número de espécies de micro-organismos psicotróficos podem estar associados à deterioração de alimentos, afetando diretamente sua qualidade e tornando-o inadequado para o consumo.

Pseudomonas é uma bactéria gram negativa, aeróbica, em forma de bastonete e não esporulada podendo ser encontradas no solo, em águas residuárias, no ar, na poeira e nos vegetais. Os micro-organismos deste gênero estão relacionados com alimentos frescos, refrigerados e congelados. Eles podem ser encontrados em alimentos que tenham sofrido contaminação pós-processamento, sendo muito comum a ocorrência de *P. fluorescens* em produtos lácteos deteriorados, entre eles o queijo Minas Frescal. Essa espécie microbiana causa modificações deletérias no alimento com produção de enzimas capazes de alterar as propriedades inerentes ao produto como: formação de limo, mudança de cor e mau cheiro, consequentemente reduzindo a sua vida de prateleira.

Este micro-organismo é altamente proteolítico, capaz de produzir enzimas termorresistentes que não são inativadas durante o tratamento térmico. As enzimas

proteolíticas produzidas por estes micro-organismos causam a proteólise do queijo produzindo gosto amargo, alterações na consistência, perdas de rendimento durante a fabricação devido à degradação da micela de caseína e influencia de forma negativa a vida de prateleira deste produto.

Diante disso, tem se buscado desenvolver e utilizar métodos que possam diminuir a carga microbiana de queijo Minas Frescal de forma a aumentar a vida de prateleira e garantir a segurança durante o consumo do produto. Uma alternativa interessante é o uso de bacteriófagos.

Bacteriófagos são uma das formas de vida mais abundantes na natureza. São vírus ubíquos no meio ambiente e não são prejudiciais para os seres humanos e os animais. A utilização de bacteriófagos como agentes antibacterianos contra um ou mais hospedeiros é uma alternativa simples, de baixo custo, de fácil aplicação e segura em termos ambientais. Permanecem viáveis mesmo em baixas temperaturas e não interferem nas características físicas e sensoriais dos alimentos.

A literatura mostra um interesse crescente na utilização de bacteriófagos no biocontrole de micro-organismos indesejáveis em alimentos. Em diversos estudos têm sido avaliado o uso de bacteriófagos no controle de micro-organismos patogênicos e deterioradores em alimentos, os quais, devido a sua especificidade, promovem a segurança dos alimentos durante o processamento e estocagem.

O uso de bacteriófagos no biocontrole de psicotróficos, especificamente *Pseudomonas* em queijo Minas Frescal pode tornar-se um instrumento útil no aumento da vida de prateleira deste produto, oferecendo incentivos econômicos e vantajosos tanto para a indústria quanto para o consumidor, resultando na diminuição de perdas associadas à deterioração bacteriana durante o armazenamento refrigerado e melhor manutenção das propriedades sensoriais do produto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Isolar, caracterizar e utilizar bacteriófagos com atividade lítica no biocontrole de *Pseudomonas* spp. em queijo Minas Frescal.

2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e caracterizar *Pseudomonas* spp. de queijo Minas Frescal disponíveis no comércio varejista, produzidos em diferentes épocas e por diferentes produtores;
- b) Isolar e caracterizar bacteriófagos para *Pseudomonas fluorescens*;
- c) Avaliar a multiplicação de *Pseudomonas* spp. e micro-organismos proteolíticos em queijos inoculados com bacteriófagos;
- d) Avaliar a viabilidade dos bacteriófagos inoculados nos queijos;
- e) Avaliar prováveis ocorrências de alterações físico-químicas nos queijos durante a estocagem.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção e consumo de queijo no Brasil

Do total de leite produzido no Brasil, 25 % é destinado à elaboração de queijos, entre eles o queijo Minas Frescal (FERNANDES, ANDREATTA e OLIVEIRA, 2006). A produção mineira de leite representa aproximadamente 26 % da produção nacional, deste volume, cerca de 21 % são utilizados como matéria prima para fabricação de queijos (ELLER, 2010).

O Brasil evidencia-se mundialmente entre os maiores produtores de queijos (CHALITA, 2009). No mercado de lácteos, o queijo se destaca como o segundo maior produto. Observou-se entre os anos de 2003 a 2007 um crescimento de 59,9 % nas exportações mundiais de queijos (GUIMARÃES et al. 2008), evidenciando o papel importante deste na cadeia de produtos lácteos (PINTO, 2010).

O Brasil não possui dados oficiais em relação à produção de queijos no território nacional devido a muitos laticínios que industrializam e vendem seus produtos regionalmente e não possuem certificação (ABIQ, 2011) do Serviço de Inspeção Municipal (SIM). A estimativa da produção de queijos é baseada nos dados de mercado e institutos de pesquisa, correspondendo a aproximadamente 60 % da produção total no Brasil referente aos laticínios registrados pelo SIF (OLIVEIRA, 2009c). A produção de queijos em pequena escala é estimada em torno de 30 ou 40 % em relação à produção oficial. Essa estimativa pode ser ligeiramente avaliada pela quantidade de queijos informais comercializados em feiras livres em todo o Brasil (FURTADO, 1991).

De acordo com a ABIQ, em 2011, a produção total de queijos no país foi de 905.938 toneladas. Deste total, 67.900 toneladas correspondem aos queijos frescos de massa crua (ABIQ, 2011). Em 2009, o queijo Minas Frescal ocupou o quinto lugar no ranking entre os queijos mais produzidos no país, mostrando um aumento de 7 % em relação a 2008 (ABIQ, 2010).

A região Sudeste é responsável por 58 % da produção de queijos sob inspeção federal (ROSOLEN, 2008), sendo o Estado de Minas Gerais o maior produtor, representando cerca de 30,4 % da produção (OLIVEIRA, 2009c). No segmento dos queijos frescos, o Minas Frescal ocupa o terceiro lugar no ranking nacional, respondendo por 7,7 % dos queijos mais produzidos (OLIVEIRA, 2009c).

O consumo de lácteos no Brasil é de 43,7 Kg *per capita*, sendo a quantidade de queijos consumida, em média, 2 Kg *per capita* por ano (EMBRAPA, 2013). Dados da ABIQ (2011) demonstram que houve um crescimento no consumo de queijos no Brasil de aproximadamente 5 % entre 2007 e 2010.

3.2. Queijo Minas Frescal

Desde o século XVIII, o queijo Minas Frescal é comumente produzido no Brasil. A técnica de fabricação do queijo Minas Frescal foi iniciada pelos dinamarqueses e holandeses no Sul de Minas Gerais e Serra da Mantiqueira, propagando-se em todo território nacional (VINHA et al. 2010).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos, o queijo Minas Frescal é classificado com um queijo fresco, de textura macia, feito de massa crua e deve ser armazenado em ambiente refrigerado (4 °C a 6 °C) e preferencialmente deve ser consumido logo após a sua fabricação (BRASIL, 1996; MONTEIRO, 2007).

O Minas Frescal é um queijo não maturado obtido pela coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes, adicionado ou não de bactérias lácticas, dessorado, não prensado e salgado. Pode ser classificado como queijo semigordo de elevada umidade, de consistência branda e macia, podendo apresentar eventualmente olhaduras mecânicas, de coloração branca, de sabor suave, baixa acidez, sem ou com crosta fina, de formato cilíndrico e com peso de 0,3 a 5 kg (BRASIL, 1997c). Apresenta pH elevado e baixo teor de sal (CARVALHO et al. 2007). Em março de 2004, o Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº 44 passou a considerar o queijo Minas Frescal como queijo semigordo (25 a 44 % de gordura no extrato seco) e de muito alta umidade (superior a 55 %) (BRASIL, 2004).

Devido às suas características físico-químicas, deve ser consumido em curto período de tempo, tendo em vista a sua alta perecibilidade e curta vida de prateleira (FURTADO, 2005a). A Tabela 1 demonstra a composição média do queijo Minas Frescal.

Tabela 1. Composição média do queijo Minas Frescal.

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

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

A composição média do leite é 87,3 % (m/v) de água, 4,9 % (m/v) de lactose, 3,6 % (m/v) de gordura, 3,3 % (m/v) de proteínas e 0,9 % (m/v) de substâncias minerais. Os componentes hidrossolúveis e algumas substâncias minerais ficam dispersos na fração aquosa (soro) (OLIVEIRA, 1986; TRONCO, 2003).

Do ponto de vista nutricional, uma porção de 100 g de queijo Minas Frescal tradicional fornece 238 calorias, devido a uma composição média de: 17,4 g de proteínas, 20,2 g de lipídeos, 579,0 mg de cálcio, 7,0 mg de magnésio, 3,2 g de carboidrato e 3,0 g de cinzas. Além disso, é um alimento rico em fósforo, sódio e vitaminas A, B2 e B12, sendo por isto classificado como um produto de elevado teor de nutrientes (OLIVEIRA, 2009c; TACO, 2011).

A fabricação do queijo Minas Frescal é realizada por indústrias de laticínios de todo porte. Na elaboração deste tipo de queijo, não é necessário a utilização de equipamentos especiais e a produção é considerada bastante simples (VIEIRA e JÚNIOR, 2004; FURTADO, 2005a). É um produto que tem grande aceitação no mercado e bom rendimento na fabricação, em torno de 6,0 a 6,5 litros de leite por quilo de queijo (FURTADO, 2005a; ALVES, 2010).

O leite como matéria-prima deste produto, deve ser submetido à pasteurização e apresentar acidez entre 14° D a 18° D, teor de gordura entre 3,0 % e 3,2 % (m/m) e ser de boa procedência. A procedência da matéria prima determina a qualidade do produto, da mesma forma que esta qualidade também é afetada pelo processamento e armazenamento adequado (OLIVEIRA, 2009c; DAGOSTIN, 2011).

De acordo com a Portaria nº 451 do Ministério da Saúde, queijos que não apresentam condições adequadas para consumo podem ser um problema de saúde pública, uma vez que este produto contaminado pode trazer riscos à saúde do consumidor (BRASIL, 1997a). Dessa forma, é necessário o controle de todas as

etapas de fabricação a fim de minimizar ou evitar a contaminação microbiana (NETTO, 2012).

O queijo Minas Frescal apresenta diversas vantagens tecnológicas: boa aceitação entre os consumidores, não necessita ser maturado e facilidade de distribuição (ROSA, 2004). Ribeiro et al. (2009) verificaram em seus estudos que o queijo Minas Frescal estocado sob refrigeração está em condição adequada de consumo ao redor de 20 dias. Sua durabilidade pode ser influenciada pelas condições físico-químicas, condições de transporte, tipo de coalho ou coagulante utilizado, utilização de fermento láctico ou não e a temperatura de estocagem no comércio varejista (FURTADO, 2005a; OLIVEIRA, 2009b).

A secretaria de Estado da Agricultura Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais (SEAPA-MG) desde 2002 incentiva a melhoria da produção de queijos. Para tal vem trabalhando no desenvolvimento contínuo do Programa Queijo Minas Artesanal. Este programa é executado pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG) em parceria com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) desenvolvendo treinamento e capacitação dos produtores na adoção de cuidados higiênico-sanitários durante a produção do queijo. O projeto visa a segurança dos alimentos com o controle sanitário dos animais e das boas práticas durante o processamento, garantindo principalmente aos pequenos produtores de leite, mais uma alternativa para a comercialização de seu produto, com maior valor agregado (IMA, 2009).

O processo de fabricação do queijo Minas Frescal é realizado pela adição de cloreto de cálcio, fermento láctico 0,5 - 1,0 % (v/v) ou ácido láctico, adição de coalho, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, salga, enformagem, embalagem e comercialização (MONTEIRO et al. 2007).

Devido o tratamento térmico do leite, há perda de cálcio solúvel, sendo este um elemento fundamental no processo de coagulação do leite (CASTILHO, 2008). A adição do cloreto de cálcio no leite para fabricação de queijos melhora as propriedades do coágulo e diminui as perdas dos componentes do soro, promovendo um coágulo mais firme, além de estimular a coagulação do leite (PERRY, 2004; OLIVEIRA, 2009c).

Normalmente, as indústrias de laticínios do Brasil utilizam o ácido láctico na fabricação do queijo Minas Frescal. O emprego do ácido láctico apresenta maiores

vantagens, pois proporciona maior rendimento, um produto final com maior teor de umidade, com acidez reduzida e pH mais elevado (NETO, 2006), além de pronunciar o *flavor* ácido e fresco (OLIVEIRA, 2009c).

O coalho é a enzima utilizada no processo de fabricação de queijos e que promove a coagulação do leite (PERRY, 2004). A temperatura do leite para adição do coalho na fabricação do queijo Minas Frescal deve estar próximo de 35 °C (MONTEIRO et al. 2007). A função do coalho na fabricação do queijo Minas Frescal é a formação da coalhada a partir da hidrólise das ligações peptídicas (PERRY, 2004) a partir da desestabilização da κ - caseína pela clivagem da ligação entre os aminoácidos Phe₁₀₅-Met₁₀₆, sendo a renina a principal enzima responsável pela coagulação. Dessa forma, a caseína fica separada em duas porções, *para* - κ - caseína que compreende a porção 1 – 105, que se integra com as demais caseínas e na presença do cálcio solúvel dá origem ao paracaseinato de cálcio (VAN DENDER, 2006). Na porção referente aos aminoácidos 106 - 169 há a formação do glicomacropetídeo (GMP), que é liberado para o soro devido à sua elevada solubilidade (ORDÓÑEZ, 2005).

O corte da massa tem por finalidade aumentar a superfície de exsudação favorecendo a eliminação do soro. Para queijos moles, o tamanho do grão deve ser de 1 cm³ a 4 cm³ de aresta. O corte da massa é realizado com o auxílio de liras horizontais e verticais. Para queijos macios, como é o caso do queijo Minas Frescal, a distância entre os fios deve ser de aproximadamente 2,0 cm (FURTADO, 1991).

A mexedura da massa deve ocorrer durante 20 a 30 minutos, com intervalos regulares. Este procedimento tem como objetivo promover a firmeza dos grãos da coalhada. A mexedura deve ser branda para evitar a fragmentação dos grãos. Em seguida ocorre a desoragem onde é eliminada a maior parte do soro (MONTEIRO et al. 2007; OLIVEIRA, 2009c).

A salga tem por finalidade dar sabor ao queijo, além de evitar a multiplicação de micro-organismos indesejáveis e promover a dessoragem. Existem várias formas para promover a salga dos queijos, as mais comuns são a salga por imersão em salmoura, salga da massa, na superfície do queijo (salga a seco), salga mista e a salga direta no leite (OLIVEIRA, 2009c). Na fabricação de queijos Minas Frescal, o método de salga mais comum é por imersão em salmoura. O tempo de permanência

dos queijos nos tanques de salmoura depende do peso, formato, tamanho, do teor de sal desejado e da umidade do queijo (GUSSO, 2009).

Na enformagem são utilizadas formas apropriadas para a fabricação de queijo Minas Frescal. A massa e a uniformidade dos queijos serão adquiridos em função da quantidade de massa colocada nas formas. Para que a massa possua as características deste tipo de queijo, é fundamental que se realize pelo menos quatro viragens (MONTEIRO et al. 2007).

A embalagem de queijos Minas Frescal é feita normalmente em laminados plásticos (OLIVEIRA, 2009c) devidamente rotulados de acordo com as normas estabelecidas pelo código de proteção e defesa do consumidor sendo armazenados sob refrigeração (4 a 6 °C) (MONTEIRO et al. 2007).

A autorização de funcionamento da produção e comercialização de queijo Minas Frescal deve ser inspecionada pelas autoridades sanitárias (VIEIRA et al. 2008). A Portaria nº 326 de 1997 do Ministério da Saúde, com o objetivo de reduzir a contaminação microbiana, regulamenta sobre as condições higiênicos-sanitárias e boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores de alimentos (BRASIL, 1997b).

3.3. Micro-organismos psicrótrópicos e vida de prateleira de produtos lácteos

A temperatura é o principal fator extrínseco responsável pela taxa de reação catalisada pelas enzimas durante as reações metabólicas das bactérias. Devido a isso, a multiplicação de algumas bactérias pode ser desacelerado com uso de temperaturas baixas durante a conservação de alimentos (JAY, 2005). No entanto, os micro-organismos psicrótrópicos encontram um ambiente propício para sua multiplicação mesmo em temperaturas de refrigeração (LORENZETTI, 2006). Durante a fase inicial de crescimento dos psicrótrópicos, poucas reações bioquímicas ocorrem nos alimentos, porém, após alguns dias de armazenamento sob refrigeração, ocorrem mudanças sensoriais e na aparência dos alimentos (COUSIN et al. 2001).

O termo psicrótrófico é dado aos micro-organismos capazes de multiplicar-se sob temperaturas entre 0 °C e 7 °C produzindo colônias visíveis em meio sólido, ou turbidez em líquidos, em um prazo de 7 a 10 dias (JAY, 2005). Estes micro-organismos apresentam-se como um subgrupo dos mesófilos, de acordo com a

classificação dos micro-organismos em função da temperatura ótima de crescimento (SILVA et al. 2010), apresentando temperatura ideal de multiplicação entre 20 °C a 40 °C (SANTOS e FONSECA, 2005). A não refrigeração do leite na fonte de produção pode favorecer a multiplicação acentuada de micro-organismos psicrotróficos, podendo causar vários problemas tanto no leite quanto nos queijos fabricados com ele (FURTADO, 1991).

Os micro-organismos psicrotróficos estão relacionados a vários gêneros, entre eles os cocos e bastonetes, esporogênicos e não esporogênicos, aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios, Gram positivas e Gram negativas (COUSIN et al. 2001; SILVA et al. 2010). Os psicrotróficos que causam problemas em queijos consistem basicamente em bactérias gram negativas pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Enterobacter*. Estes micro-organismos são capazes de produzir enzimas resistentes durante o tratamento térmico. As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as principais responsáveis pela deterioração de produtos lácteos, sendo *P. fluorescens* a espécie mais recorrente nestes alimentos (FURTADO, 2005a; SILVA, 2010). Em um estudo realizado por Acuri et al. (2008) para verificar o nível de contaminação de leite cru com bactérias psicrotróficas foi observado que, dentre as variedades de gêneros bacterianos psicrotróficos encontrados, o gênero *Pseudomonas* foi o de maior prevalência.

Para sobreviver, os micro-organismos psicrotróficos evoluíram os mecanismos fisiológicos e genéticos para tolerar algumas condições físicas extremas, como a capacidade de manter a viabilidade a baixas temperaturas em função do elevado teor de ácidos graxos insaturados presentes na membrana da célula. Devido às mudanças adaptativas dos lipídios de membrana, as atividades metabólicas desses micro-organismos ocorrem mesmo em condições adversas (RUSSEL, 1990; BEALES, 2004; JAY, 2005).

Nas indústrias de alimentos a deterioração é um problema grave, podendo causar prejuízos financeiros além de comprometer a qualidade dos produtos tornando-os inaceitáveis pelos consumidores (PEREIRA, 2011). Na indústria de laticínios as bactérias psicrotróficas são conhecidas pelo seu potencial de deterioração associada às significativas perdas econômicas (MUNSCH-ALATOSSAVA et al. 2012). A taxa de deterioração dos produtos lácteos é

dependente do tipo de produto elaborado, composição, formulação, embalagem e forma de armazenamento podendo ocorrer em qualquer etapa de produção, desde a aquisição da matéria-prima até o produto final (GOULD, 1995).

A microbiota inicial do leite cru bem como as práticas higiênicas insatisfatórias pode influenciar a qualidade dos produtos elaborados favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos deterioradores responsáveis pelas alterações indesejáveis nesse produto, depreciando a sua qualidade tornando-o inaceitável ou até mesmo inadequado ao consumo humano (RICHER e VEDAMUTHU, 2001; ROCHA et al. 2006; PEIXOTO et al. 2007).

A multiplicação de micro-organismos psicrotróficos no leite causa vários problemas para a indústria queijeira (FURTADO, 2005), por produzirem enzimas proteolíticas que degradam as proteínas em peptídeos, aminoácidos, alcoóis e aldeídos, ocorrendo alterações no produto sob refrigeração, além de ocorrer modificações sensoriais e consequentemente causar a deterioração do produto (SANGALETTI, 2007).

A proteólise é um dos principais fenômenos bioquímicos no desenvolvimento de características sensoriais que ocorrem durante a estocagem do queijo e que compromete a sua vida de prateleira (DAGOSTIM, 2007; NETTO, 2012). Este evento ocasiona diversos problemas tecnológicos, como a diminuição do rendimento de queijos devido à degradação parcial da β -caseína e κ -caseína liberando peptídeos de baixa massa molecular e nitrogênio não protéico (NPN) na forma de amônia com perdas de compostos nitrogenados no soro, diminuição de rendimento na fabricação e consequentemente, o aparecimento de gosto amargo no queijo (FURTADO, 2005).

A deterioração dos alimentos é um problema que ainda não está totalmente sob controle apesar da tecnologia moderna aliada aos métodos de preservação disponíveis (JOS, 1996).

3.4. Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* faz parte da ordem dos Pseudomonadales, da família Pseudomonadaceae (SPIERS et al. 2000). É uma bactéria Gram negativa, aeróbia, em forma de bastonete retos ou curvos (0,5 μm – 1,0 μm de diâmetro por 1,5 μm – 5,0 μm de largura), não formadoras de esporos, sendo que a maioria das

bactérias desta família são móveis pela presença de flagelos polares (SILLANKORVA, 2004). Flagelos laterais podem ser encontrados em algumas espécies e exige condições aeróbias para sobrevivência (SILVA et al. 2010).

São catalase e citrato positiva, oxidase positiva ou negativa e indol negativo. Não produzem H₂S podendo formar pigmentos fluorescentes (fenazinas verdes, azuis ou laranjas ou pioverdinas verde amareladas) e não fluorescentes (verdes, laranja, amarelos ou azuis) (RODHES, 1959; SILVA et al. 2010).

Pseudomonas caracterizam-se por serem termolábeis, podendo ser encontradas no solo, em águas residuárias, no ar (EVANGELHISTA, 2003), na poeira em suspensão e nos vegetais (SILVA et al. 2010). Possuem tempo curto de geração em temperaturas de refrigeração (SANTOS et al. 2010) e em condições de pH abaixo ou igual a 4,5, nenhuma espécie de *Pseudomonas* é capaz de se multiplicar (SILVA et al. 2010).

O que confere a maior versatilidade do gênero *Pseudomonas* em temperaturas de refrigeração em relação a outros micro-organismos é a presença de 59 % a 72 % de lipídeos insaturados em sua membrana (JAY, 2005).

As necessidades nutricionais do gênero *Pseudomonas* são simples (FRANZETTI e SCARPELLINI, 2007), sendo capazes de utilizar uma grande quantidade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (SILVA et al. 2010). Sua reserva de carbono obtida é por acúmulo de poli-β-hidroxibutirato (HOLT et al. 1993) e utilizam amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio (SILVA et al. 2010).

Os micro-organismos psicotróficos do gênero *Pseudomonas* estão relacionados a alimentos frescos refrigerados (JAY, 2005), alimentos processados que sofreram contaminação pós processamento e alimentos congelados (FRANCO e LANDGRAF, 2008), sendo também comumente encontrados em produtos lácteos deteriorados (SILVA et al. 2010).

P. fluorescens é um grande e heterogêneo grupo de bactérias Gram negativas do gênero *Pseudomonas* que é subdividida em biotipos baseada em diversas características fenotípicas (PALLERONI, 1984). 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 (MARGESIN e SCHINNER, 1992). Apresenta temperatura ótima de multiplicação entre 25 °C a 30 °C pode ser

encontrada na água e no solo (KRIEG e HOLT, 1984). A característica comum entre os membros de *P. fluorecens* é a produção de enzimas proteolíticas e lipases extracelulares (STANIER et al. 1966). Esses micro-organismos são capazes de hidrolisar lipídeos e proteínas e causar alterações sensoriais em produtos lácteos como modificações na cor, sabor e aroma. Raramente apresenta mecanismos de patogenicidade (SILLANKORVA, 2004).

4. Bacteriófagos

4.1. Definição, caracterização e aplicações

Os bacteriófagos ou fagos representam uma das mais abundantes formas de vida encontradas na natureza (BRUSSOW e HENDRIX, 2002). São vírus relativamente específicos para determinado hospedeiro e esta especificidade permite o biocontrole da bactéria de interesse (HENRIQUEZ, 2008), tornando-os agentes ideais para aplicações destinadas a aumentar a segurança dos alimentos durante o seu processamento (HAGENS e LOESSNER, 2007).

Todos os bacteriófagos não possuem metabolismo próprio, portanto, são parasitas obrigatórios e dessa forma, precisam de um hospedeiro para se multiplicar. Na ausência de um hospedeiro, a existência do fago se restringe a um estado metabolicamente inerte. A capacidade de infectar somente organismos procariotos é uma diferenciação dos bacteriófagos em relação à outros vírus. Os bacteriófagos são ubíquos na natureza, e até 10^8 partículas fágicas podem ser isoladas a partir de 1 g de solo ou água (BREITBART et al. 2003; WITHEY, 2005; PETTY et al. 2007). São vírus que não causam nenhum efeito prejudicial ao homem aos animais e ao ambiente (HENRIQUEZ, 2008).

A maioria dos bacteriófagos pertencem à ordem Caudovirales, apresentam cauda e cabeça icosaédrica contendo DNA de cadeia dupla. O reconhecimento de moléculas na superfície da membrana do hospedeiro está associado a diferentes proteínas localizadas na cauda dos bacteriófagos, que lhes conferem desta forma certa especificidade (HAGENS e LOESSNER, 2007).

Os bacteriófagos são subdivididos em 13 famílias sendo as mais frequentes: *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae*, além de demonstrarem uma grande variedade morfológica (Figura 1). Podem medir entre 24 e 200 nanômetros, possuem

capsídeos (cabeça) que pode ser de forma icosaédrica, cúbica, filamentosa ou pleomórfica e presença de cauda, os quais são utilizada como parâmetros na classificação de acordo com a sua taxonomia (ALCKERMANN, 2005). De todos os fagos examinados desde 1959, 96 % possuem cauda (DABROWSKA, 2005).

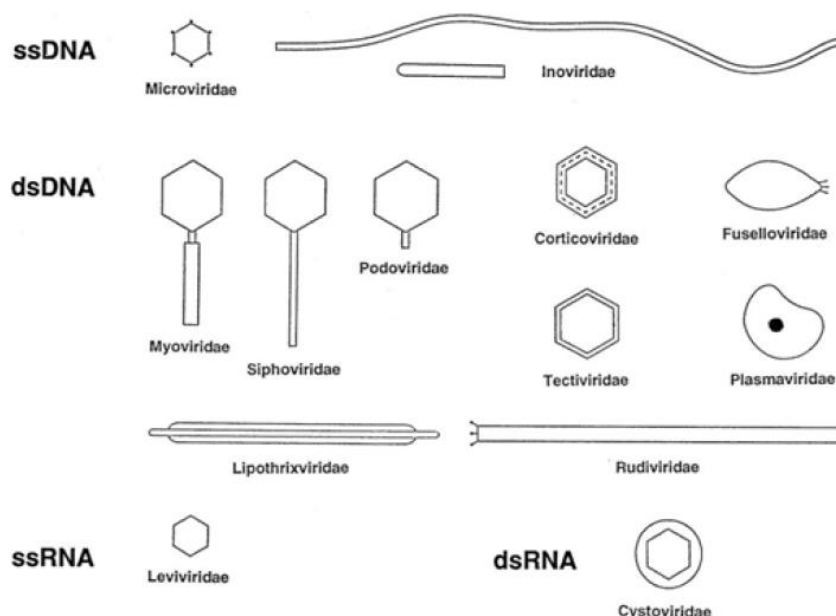


Figura 1. Tipos de morfologia de bacteriófagos

Fonte: KUTTER e SULAKVELIDZE, (2000).

Os bacteriófagos são constituídos por ácido nucleico (DNA ou RNA) e proteínas. O ácido nucleico pode ser de cadeia dupla ou de cadeia simples, dependendo do bacteriófago (HENRIQUEZ, 2008).

De acordo com o ciclo de replicação envolvido na infecção do hospedeiro, os bacteriófagos podem apresentar-se como virulentos (ciclo lítico) ou temperados (ciclo lisogênico) (Figura 2). A destruição do hospedeiro ocorre quando os bacteriófagos lítico (virulentos), replicam-se no interior da célula hospedeira (HAGENS e LOESSNER, 2007) causando a lise da célula bacteriana para liberar os fagos recém formados (SKURNIK e STRAUCH, 2006). Os bacteriófagos virulentos são uma opção para uso no biocontrole de micro-organismos indesejáveis (HAGENS e LOESSNER, 2007).

No ciclo lisogênico (bacteriófagos temperados) os bacteriófagos integram-se no genoma do hospedeiro e permanecem em um estado dormente por longos períodos de tempo (SKURNIK e STRAUCH, 2006). Esse tipo de bacteriófago não é

utilizado na fagoterapia e em certos casos, podem conter genes que tornam a bactéria mais virulenta (KROPINSKI, 2006).

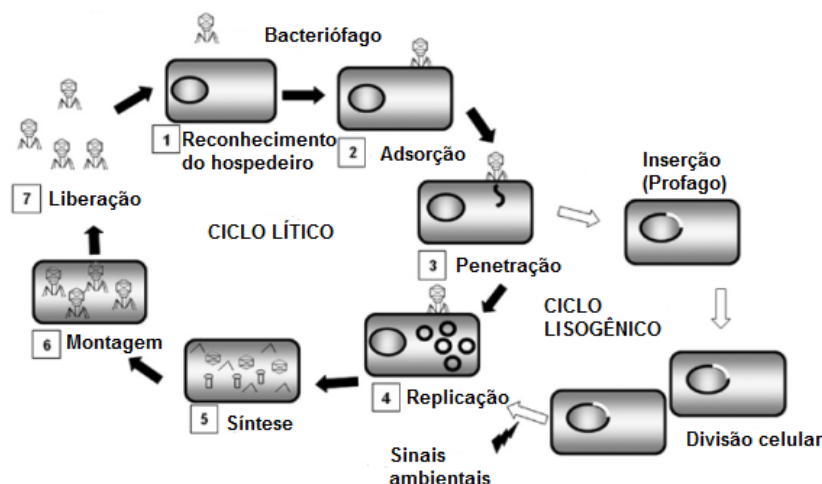


Figura 2. Ciclo lítico e lisogênico de bacteriófagos

Fonte: Garcia et al. (2010) adaptado.

Ao contrário da resistência bacteriana aos quimioterápicos, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar as barreiras do hospedeiro à infecção. Isto leva a um equilíbrio evolutivo permitindo a proliferação de bacteriófagos e hospedeiros (CARRILLO et al. 2005). No entanto, medidas técnicas como o uso alternado de um *pool* de bacteriófagos diferentes em um coquetel ou em aplicações alternadas podem reduzir a frequência da resistência (HAGENS e LOESSNER, 2007).

De acordo com Hudson (2005) a eficiência dos bacteriófagos pode limitar-se pela presença de células bacterianas não hospedeiras. Nessas condições, o controle biológico pode tornar-se ineficiente. Além disso, fatores genéticos e ambientais também podem influenciar na interação bacteriófago-hospedeiro reduzindo a sua eficácia como agente antimicrobiano (JOERGER, 2003).

Os bacteriófagos têm sido reconhecidos como agentes bioterapêuticos (MAHONY et al. 2010) e pelo impacto sobre o desenvolvimento de novas tecnologias para combater patógenos em alimentos (MAHONY et al. 2011), incluindo a nanotecnologia, estratégias de detecção de bactérias e processos industriais (PETTY et al. 2005). Podem oferecer vantagens em relação às terapias convencionais, por estarem presentes no mesmo habitat que seus hospedeiros e serem específicos (CONNERTON et al. 2011).

A partir do ano de 1915, a fagoterapia foi proposta e implementada para o tratamento de doenças infecciosas. (HAGENS e LOESSNER, 2010). Com o

desenvolvimento dos antibióticos, houve uma redução nos estudos relacionados à fagoterapia (HAGENS e LOESNNER, 2007).

A fagoterapia tem como princípio a especificidade das espécies bacterianas que os bacteriófagos irão infectar, ao contrário dos antibióticos que não são específicos e destroem as células bacterianas (BRUSSOW, 2005). Diante da elevada resistência dos micro-organismos frente aos antibióticos, vem se observando um aumento nas pesquisas relacionados à fagoterapia.

4.2. Utilização de bacteriófagos como biocontrole em alimentos

A inocuidade dos alimentos é ainda uma questão de grande preocupação, apesar da introdução de novas tecnologias e conceitos de segurança na indústria de alimentos. A crescente demanda para alimentos seguros e o conhecimento dos consumidores sobre os potenciais riscos para a saúde associados ao uso de conservantes nos alimentos levou a pesquisa de novas estratégias para a preservação de alimentos. Nos últimos anos, a indústria de alimentos tem demonstrado um grande interesse na utilização de agentes antimicrobianos de ocorrência natural para inibir o desenvolvimento de patógenos e a multiplicação de micro-organismos deterioradores (MARTÍNEZ et al. 2008).

A utilização de bacteriófagos na produção de alimentos tem sido proposta como uma alternativa para a indústria de alimentos como um método de controle biológico em toda a cadeia alimentar (Figura 4) aumentando a segurança especialmente de alimentos frescos (HAGENS e LOESSNER, 2010; GARCIA et al. 2008).

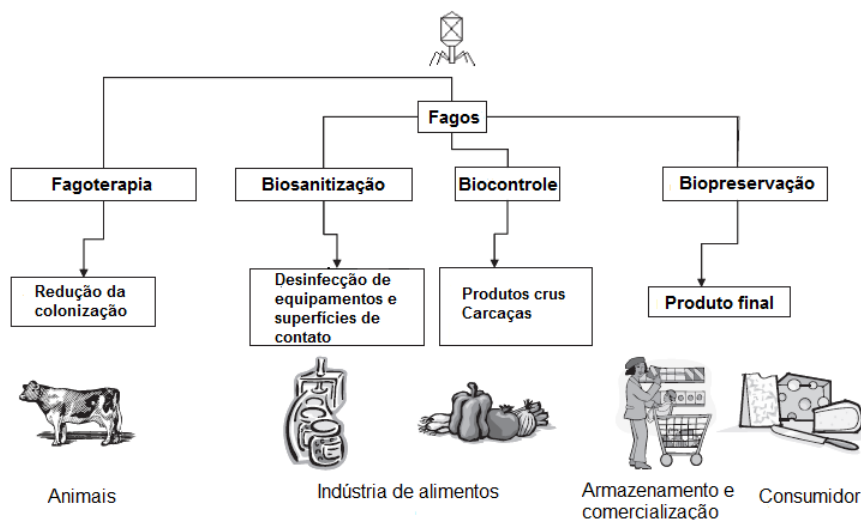


Figura 3. Exemplos da aplicação de bacteriófagos ao longo da cadeia alimentar.

Fonte: Garcia et al. (2008) adaptado.

A especificidade dos bacteriófagos na eliminação de micro-organismos indesejáveis é uma propriedade desejada em um agente antimicrobiano para uso em alimentos, pois mantêm sua qualidade, especialmente no caso de alimentos fermentados e outros produtos produzidos com o auxílio de micro-organismos (GUENTHER et al. 2009). Os bacteriófagos também podem ser utilizados na teoria de obstáculos em combinação com outros diferentes métodos de conservação (LEVERENTZ et al. 2003; MARTÍNEZ et al. 2008). Leverentz et al. (2003) observaram que houve uma maior redução de *Listeria monocytogenes* em frutas frescas no tratamento com bacteriófagos associado ao uso de nisina. Estes mesmos autores sugerem que além do uso da nisina, também pode ser combinada outras medidas de controle, como pH e temperatura.

Diversos fatores podem influenciar na eficácia do biocontrole de alimentos com bacteriófagos, como por exemplo, estabilidade dos bacteriófagos frente às condições intrínsecas e extrínsecas dos alimentos (atividade de água – Aa, pH e temperatura), estocagem e a razão entre a concentração de bacteriófagos e de células bacterianas hospedeiras, conhecido como Multiplicidade de Infecção (MOI) (HUDSON et al. 2005). Hagens e Loesnner (2007) sugerem o uso alternado de bacteriófagos diferentes ou em coquetel. Essa alternativa é uma estratégia para evitar a resistência bacteriana frente à atividade lítica do bacteriófago.

Diante da eficácia dos bacteriófagos no controle biológico de micro-organismos em alimentos, foram introduzidas várias maneiras de aplicação dos bacteriófagos nos alimentos, incluindo a imersão, pulverização e o preparo de uma solução de fagos para lavagem de alimentos em maiores quantidades. (HAGENS e LOESSNER, 2010).

Porém, deve ser investigado com mais critério a utilização de bacteriófagos no controle de micro-organismos na produção de alimentos, afim de aumentar o conhecimento sobre especificidade e desenvolvimento de resistência (HÚNGARO, 2010).

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

5.1. Micro-organismo hospedeiro

Na realização desta pesquisa foi utilizada a estirpe de *P. fluorescens* ATCC 13525, proveniente do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. Este micro-organismo foi utilizado como hospedeiro no processo de propagação de bacteriófagos específicos e na contaminação induzida de queijos Minas Frescal fabricados em condições laboratoriais para este experimento. A cultura foi mantida estocada em caldo triptona de soja (TSB Merck®), contendo 20 % (p/v) de glicerol (Vetec®) como crioprotetor e mantidos a - 20 °C.

5.1.2. Micro-organismos utilizados na avaliação de especificidade

Na realização do teste de especificidade com os bacteriófagos isolados foram utilizadas estirpes de *P. aeruginosa* ATCC 25619, *P. putida* ATCC 15145, *P. alcaligenes* ATCC 14904, *Escherichia coli* ATCC 23229, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Alcaligenes faecalis* ATCC 7966, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhi ATCC 19430, *Salmonella* Choleraesuis ATCC 10708, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Hafnia alvi* ATCC 11604, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

proveniente do Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro e estirpes bacterianas isoladas dos queijos Minas Frescal adquiridos no comércio varejista de diferentes épocas e regiões. Estes micro-organismos foram utilizados como hospedeiro na avaliação da especificidade dos bacteriófagos. As culturas foram mantidas estocadas em caldo triptona de soja (TSB Merck®), contendo 20 % (p/v) de glicerol (Vetec®) como crioprotetor e mantidos a - 20 °C.

5.1.3 Coleta de amostras para isolamento de bacteriófagos

As amostras para o estudo foram coletadas nos meses de setembro e outubro de 2012, a partir de exsudado de frangos congelados e de água residuária de laticínios, respectivamente. Cada amostra foi constituída de aproximadamente 50 mL, coletadas em coletor universal estéril (J. Prolab®) e posteriormente armazenadas a 4 °C até o momento da análise.

5.2. Isolamento de *Pseudomonas* spp. de queijos Minas Frescal do comércio varejista

Foram adquiridos 31 queijos do comércio varejista de Viçosa e região em diferentes épocas e encaminhados sob refrigeração em caixas de isopor para o laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) para o isolamento de *Pseudomonas* spp. de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2010)

Os queijos foram retirados assepticamente de sua embalagem original, porcionados aleatoriamente até se obter 25 g do produto e adicionados de 225 mL de água peptonada tamponada (Himedia®) 0,1 % (m/v). As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador (Marconi, MA 440). As amostras foram homogeneizadas por 3 minutos seguido de plaqueamento pelo método *spread plate* em meio de cultura ágar cetrimide (Himedia®). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Colônias típicas foram estriadas por esgotamento em ágar cetrimide (Himedia®) e foram as colônias isoladas foram armazenadas em *eppendorfs* esterelizados contendo caldo triptona de soja (TSB) (Merck®) com 20 % de glicerol a - 20° C.

5.2.1. Caracterização bioquímica e molecular dos isolados

Os isolados bacterianos foram classificados quanto ao gênero por meio da caracterização bioquímica realizada através dos seguintes testes de confirmação: oxidase (Laborclin®), citrato de Simmon's (Oxoid®), catalase (Farmax®), indol (Fluka®), motilidade (Fluka®), produção de H₂S (Fluka®), coloração de Gram e morfologia (Olympus CX40RF100), segundo a metodologia descrita por SILVA et al. (2010).

No teste de oxidase, uma colônia retirada com o auxílio da alça de platina foi espalhada sobre fita de oxidase (Laborclin®). O teste é considerado positivo devido o aparecimento de coloração roxa.

As culturas citrato positivo foram identificadas pela presença de crescimento na superfície do ágar, acompanhado de coloração azul no meio de cultura.

Para verificação da capacidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, adicionou-se 1 gota de peróxido de hidrogênio 3 % (v/v) (Farmax®) em uma colônia isolada e observou-se a formação de bolhas, resultado associado a liberação de oxigênio em função da degradação enzimática do peróxido de hidrogênio pela catalase.

A presença de H₂S foi verificada pela formação de precipitado negro ao longo da linha de inoculação da bactéria em meio semi sólido SIM (Sulfureto Indol Mobilidade) (Fluka®) com o auxílio da alça de picada.

A motilidade foi observada inoculando-se a bactéria em linha reta, com o auxílio da alça de picada, 2/3 de meio semi-sólido SIM (Sulfureto Indol Mobilidade) (Fluka®). O deslocamento da linha de inoculação e a turvação do meio indica motilidade.

A presença de indol foi verificada adicionando-se o reagente de Kovac's (Cromoline®) ao longo das paredes do tubo com meio semi-sólido SIM (Sulfureto Indol Mobilidade) (Fluka®). Este reagente reage com o indol produzindo um composto rosado.

Em relação à coloração de Gram, preparou-se o esfregaço, corou-se conforme a metodologia de Gram descrita por Silva et al. (2010) e observou-se em microscópio óptico (Olympus CX40RF100) a presença de bacilos gram negativos.

A caracterização molecular foi realizada por amplificação do fragmento na região 16S ribossomal (rDNA) para *Pseudomonas* spp. de acordo com a

metodologia proposta por Spilker (2004), utilizando a sequência dos oligonucleotídeos descritos na Tabela 2:

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos utilizada para amplificação do fragmento na região 16S.

Primer	Sequência	Localização	Tamanho do produto (pb)
PA.GS-F	5' GACGGGTGAGTAATGCCTA 3'	95-113	618
PA.GS-R	5' CACTGGTGTTCTTCCTATA 3'	693-712	

Fonte: SPILKER et al.(2004) adaptado

Na caracterização molecular foi realizada a comparação dos tamanhos de pares de base dos isolados em relação ao controle positivo. Como controle positivo, diferentes espécies de *Pseudomonas* (*P. alcaligenes* ATCC 14904, *P. putida* ATCC 15145, *P. aeruginosa* ATCC 25619 e *P. fluorescens* ATCC 13525) foram utilizados. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1 % (Sigma Aldrich®) em tampão TBE 1X (40 mmol⁻¹ Tris-acetato (Sigma Aldrich®) e 1 mmol⁻¹ EDTA (Sigma Aldrich®), pH 8,0) por electroforese (Major Science MR 250V) por 1 h a 90 V e posteriormente visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Loumart) foto documentado utilizando o sistema Quantum ST4-1000/26mX.

5.2.2. Extração e purificação do DNA

O DNA bacteriano foi extraído pelo método da fervura (VIZZOTTO, 2009). Para extração do DNA cerca de 3 a 5 colônias das estirpes bacterianas isoladas foram suspensas em 500 µL de água destilada esterelizada e as suspensões foram fervidas por 10 min para liberação do DNA e então centrifugadas a 13000 x g em microcentrífuga (Sigma, 3K30, rotor 12111H) por 1 min e 30 s. Após a centrifugação, 150 µL do sobrenadante foram transferidos para outro *ependorf* esterelizado e subsequentemente foram mantidos a temperatura de - 20 °C até o momento da análise.

5.2.3. Amplificação do fragmento na região 16S

A amplificação do fragmento na região específica 16S rDNA de *Pseudomonas* spp., foi realizada conforme procedimento descrito por Spilker et al. (2004) utilizando os primers PA.GS-F (5' GACGGGTGAGTAATGCCTA 3') e PA.GS-R

(5' CACTGGTGTTCCTTCCTATA 3') (Sigma Aldrich®). A amplificação foi preparada para um volume final de 50 µL, contendo 10 µL de tampão da Taq polimerase 10X (Promega), 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 1 U de Taq DNA polimerase (Promega), 1 µL BSA (albumina de soro bovino) 10 mg mL⁻¹ (Promega), 2 µL de cada iniciador (10 mmol/L) (Sigma Aldrich®), 33,0 µL de água ultra pura esterilizada e 0,5 µL de DNA (aproximadamente 5 - 10 ng).

Para a reação de PCR utilizou-se o termociclador THERM 1000/Maxygene. O seguinte programa foi empregado: 1 ciclo de 95 °C por 2 minutos desnaturação inicial; 25 ciclos de 94°C por 20 segundos de desnaturação, seguida de anelamento a 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 40 segundos de extensão; seguidos de 1 ciclo a 72 °C por 1 minutos extensão final, finalizando com temperatura de 4 °C.

A detecção do produto de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Sigma Aldrich®) a 1 % em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol L⁻¹ (Sigma), ácido bórico 89 mmol L⁻¹ (Promega) e EDTA 1 mmol L⁻¹ (Vetec), pH 8,3) de acordo com metodologia proposta por SAMBROOK; RUSSELL (2001). A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem de 90 V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi observado e foto documentado sob luz UV utilizando o sistema Quantum ST4-1000/26mX.

5.3. Isolamento dos bacteriófagos

5.3.1. Isolamento de bacteriófagos de água residuária

Para o isolamento de bacteriófagos líticos para *P. fluorescens* foi utilizada a metodologia adaptada descrita por Sambroock e Russel (2001). Em 10 mL de água residuária, coletados na indústria de laticínios situada na Universidade Federal de Viçosa, foi adicionado 1 mL de cultura de *P. fluorescens* (ATCC 13525) incubada por 16-18 h a 30 °C. As amostras foram incubadas sob agitação em *shaker* (Solab, SL 221) por 150 rpm a 17 °C por 24 h. Após este período, a suspensão foi centrifugada (*Eppendorf*, 5804R) 3000 x *g* 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 proposta por Húngaro (2010), utilizando *P. fluorescens* (ATCC 13525) como micro-organismo hospedeiro.

5.3.2. Isolamento de bacteriófagos de exsudado de frangos congelados

Para o isolamento de bacteriófagos líticos para *P. fluorescens*, foi utilizada metodologia adaptada de Sambrook e Russel (2001) e Atterbury et al. (2005). Em 10 mL de amostra de exsudado de frangos congelados foram diluídos 1:1 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 ressuspendido por agitação durante 5 min. Esta suspensão foi então incubada em *shaker* (Solab, SL 221) a 17 °C por 24 h, para permitir a eluição do fago para o tampão. Após este período, uma alíquota de 8 mL da suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga esterilizado com capacidade de 50 mL, ao qual foi adicionado 1 mol L⁻¹ NaCl (Vetec®) e mantido em repouso por 15 min. Foram adicionados 10 % de clorofórmio (v/v) (Vetec®) e os tubos foram mantidos a 4 °C por 30 min. Em seguida, foram centrifugados a 3.000 x *g* por 20 min a 4 °C para remover detritos em suspensão. A detecção da presença dos bacteriófagos na suspensão foi realizada por meio da técnica de microgotas em superfície proposta por Húngaro (2010), utilizando *P. fluorescens* (ATCC 13525) como micro-organismo hospedeiro.

5.3.3. Purificação dos bacteriófagos

Foram adicionados 100 µL do concentrado de vírus obtido conforme descrito nos itens 5.3.1 e 5.3.2 a 100 µL da cultura bacteriana de *P. fluorescens* (ATCC 13525) incubada por 16-18 h a 30 °C. A suspensão resultante foi incubada a 30 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 5 mL de caldo triptona de soja para sobrecamada contendo 0,7 % de ágar sobrecamada (TSA_s) (Himedia®). Essa mistura foi vertida em placa contendo ágar base triptona de soja (Merck®) (TSA_b) e incubada a 30 °C por 16-18 h. Após a incubação, uma placa de lise individual foi selecionada e removida com o auxílio de uma pipeta tipo Pasteur e colocada em 5 mL de cultura ativa do hospedeiro e incubada a 30 °C por 16 - 18 h. Para cada fago, três ciclos de purificação foram realizados, a fim de garantir a pureza do estoque de bacteriófagos.

5.3.4. Seleção de bacteriófagos

Os bacteriófagos obtidos de água residuária de laticínios e exsudado de frangos congelados, foram selecionados por meio de avaliação da formação de lise transparente sobre a cepa de *P. fluorescens* (ATCC 13525) em ágar sobrecamada (TSA_s).

5.3.5. Propagação de bacteriófagos

Para propagação de bacteriófagos, foi utilizada a metodologia descrita por Sambroock e Russel (2001). Foram inoculados 500 µL da cultura de *P. fluorescens* (ATCC 13525) em um tubo com 5 mL de ágar sobrecamada (TSA_s) e vertido em placa contendo ágar base (TSA_b). Microgotas (10 µL) de bacteriófagos foram colocadas sobre as placas e estas foram incubadas a 30 °C por 14 - 16 h. Após este período, foi adicionado 10 mL de tampão SM e em seguida homogeneizado em *shaker* (Solab, SL 221) a 120 rpm a 17 °C por 24 h. O tampão SM após homogeneização foi recolhido em tubo de centrífuga estéril com capacidade para 50 mL e em seguida centrifugado (*Eppendorf*, 5804R) a 4000 x *g* por 20 min a 4 °C. Posteriormente a suspensão foi filtrada em membrana de éster de celulose (Milipore®) com poro de 0,22 µm e 25 mm de diâmetro. O filtrado foi recolhido em tubo esterilizado e armazenado a 4 °C.

A presença de bacteriófagos nas suspensões foi avaliada por meio da técnica de microgotas em superfície proposta por Húngaro (2010) utilizando *P. fluorescens* (ATCC 13525) como micro-organismo hospedeiro.

5.3.6. Titulação e estoque de bacteriófagos

Na determinação da concentração de bacteriófagos na suspensão, foi utilizado tampão SM para realizar as diluições necessárias, a fim de obter contagem de Unidades Formadoras de Placas (PFU) entre 10 a 100 placas de lise por mL de suspensão (CARRILO et al. 2005). As diluições foram incubadas por 5 min com a cultura bacteriana de *P. fluorescens* (ATCC 13525) incubadas a 30 °C por 14 - 16 h. Em seguida, foram adicionados 5 mL de ágar sobrecamada (TSA_s). Essa mistura foi vertida em placa contendo ágar base (TSA_b) e incubada a 30 °C por 16 - 18 h. Após este período, procedeu-se a contagem do número de placas de lise e foi calculado o título de bacteriófagos em PFU mL⁻¹ através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume da diluição (mL)}} = \text{PFU mL}^{-1}$$

5.3.7. Análise da morfologia de bacteriófagos

O exame morfológico de bacteriófagos foi realizado segundo a metodologia descrita por Oliveira (2009a). Um volume de 1 mL de uma suspensão de 10^9 PFU mL^{-1} foi centrifugado (Sigma, 3K30, rotor 12111H) a $9000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com solução de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e novamente centrifugado (Sigma, 3K30, rotor 12111H) a $9000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de água destilada e microfiltrado. Um volume de 8 μL desta suspensão foi depositado na superfície de uma tela de microscopia eletrônica, revestida com resina *formar* (Kosh®, 200 mesh, 3 mm). O excesso de amostra foi removido com papel absorvente e adicionado uma gota de solução aquosa de acetato de uranila 2 % (m/v) (Sigma Aldrich®) na superfície da tela, deixando em contato por 15 s. O excesso de acetato de uranila foi removido com papel absorvente. A tela foi lavada com uma gota de água destilada e em seguida seca em temperatura ambiente, aproximadamente 24°C por 24 h. Posteriormente, foi feita a observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, EM109) em 80 kV e aumentado em 85000 vezes.

5.3.8. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados

Foram utilizados no teste diferentes gêneros e espécies de culturas bacterianas de importância em alimentos provenientes do LAMPOAH do DTA da UFV selecionadas previamente (*P. aeruginosa* ATCC 25619, *P. putida* ATCC 15145, *P. alcaligenes* ATCC 14904, *Escherichia coli* ATCC 23229, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Alcaligenes faecalis* ATCC 7966, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhi ATCC 19430, *Salmonella* Choleraesuis ATCC 10708, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Hafnia alvi* ATCC 11604, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e sobre 39 estirpes bacterianas isoladas de queijo Minas Frescal do comércio varejista de diferentes épocas e regiões e propagadas conforme o item 5.2.3 para avaliar a especificidade dos bacteriófagos selecionados. Foram depositados 10 μL de cada

suspensão de fagos sobre a superfície das placas contendo a “lâmina” das culturas, em triplicata (SILVA, 2010). Após absorção da suspensão de bacteriófagos, as placas foram incubadas na faixa de temperatura de 30 e 37 °C por 18 a 24 h, de acordo com a temperatura ótima de crescimento de cada micro-organismo. A especificidade dos bacteriófagos foi avaliada pela técnica de microgotas em superfície conforme proposta por Húngaro (2010), usando a suspensão de bacteriófagos na concentração de no mínimo 10^9 PFU mL⁻¹.

5.3.9. 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 dois bacteriófagos isolados neste estudo. A extração do DNA e ensaio de restrição foi desenvolvido de acordo com Kumari et al.(2009).

5.3.10. Extração do DNA

Em 700 µL das suspensões de bacteriófagos purificados (10^{10} - 10^{11} PFU mL⁻¹) foram adicionados Proteinase K (Promega®) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (USB®) a uma concentração final de 0,05 mg mL⁻¹ e 0,5 % (m/v) respectivamente e incubadas em banho maria (Fanem) a temperatura de 56 °C. Após 1h e 30 min de incubação, 700 µL de uma solução 1:1 (v/v) de fenol clorofórmio (Sigma Aldrich®) foram adicionadas para desproteinização. As suspensões foram mantidas em banho de gelo por 10 min e em seguida centrifugadas (Sigma, 3K30, rotor 12111H) a 9950 x g por 10 min. O sobrenadante foi recolhido em micro tubo esterelizado. A etapa de desproteinização foi repetida com clorofórmio (Vetec®) e o sobrenadante recolhido. Foram adicionados 700 µL de isopropanol (Vetec®) para a precipitação do DNA e a suspensão resultante foi incubada a - 20° C por aproximadamente 18 h. Após o descongelamento, a suspensão foi centrifugada (Sigma, 3K30, rotor 12111H) a 19500 x g por 20 min e o sobrenadante descartado. O ácido nucléico foi precipitado com 500 µL de etanol (Vetec®) refrigerado e o material foi centrifugado (Sigma, 3K30, rotor 12111H) por 5 min a 9950 x g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi resuspendido em 20 µL de água ultra pura.

5.3.11. Ensaio de restrição

O ensaio de restrição enzimática do DNA dos bacteriófagos isolados foi realizado segundo a metodologia descrita por Kumari et al. (2009). Foi utilizada neste experimento 1,0 µL das endonucleases de restrição *Hae* III (Sigma Aldrich®), *Hinf* I (Sigma Aldrich®), *Hind* III (Sigma Aldrich®), *Apa* I (Sigma Aldrich®) e *Hha* I (Sigma Aldrich®) adicionada a 22,8 µL de água ultra pura, 4 µL de DNA purificado do bacteriófago, 2,0 µL de tampão da enzima (Sigma Aldrich®) e 0,2 µL de albumina de soro bovino acetilado (BSA) (Promega®). A digestão de restrição ocorreu a 42 °C por 3 h em banho-maria (Fanem) e posteriormente 10 µL da reação foi eluída em gel de agarose (Sigma Aldrich®) 1,5 % no 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 tamanho 1 Kb DNA Ladder (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.

6. Elaboração dos queijos Minas Frescal

6.1. Análise estatística

O experimento foi montado no Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) disposto em esquema de parcelas subdivididas, sendo na parcela o efeito do bloco (3 repetições), tratamentos (T1 Controle, T2, T3, T4 e T5) e na sub parcela o tempo de armazenamento (0, 7, 14 e 21 dias) e a interação tratamento e tempo de armazenamento. O experimento foi repetido 3 vezes.

As concentrações de bacteriófagos utilizada em cada tratamento foram atribuídas da seguinte forma:

T1: controle negativo (queijo não inoculado)

T2: controle positivo (queijo + *P. fluorecens* 10⁴ UFC mL⁻¹)

T3: queijo + *P. fluorecens* 10⁴ (UFC mL⁻¹) + bacteriófago 10⁴ (PFU mL⁻¹)

T4: queijo + *P. fluorecens* 10⁴ (UFC mL⁻¹) + bacteriófago 10⁶ (PFU mL⁻¹)

T5: queijo + *P. fluorecens* 10⁴ (UFC mL⁻¹) + bacteriófago 10⁸ (PFU mL⁻¹)

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA) versão 9.2, licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa.

6.2. Análises microbiológicas dos queijos elaborados

As análises microbiológicas para contagem de *Pseudomonas* spp. e micro-organismos proteolíticos foram realizadas no leite e no soro no dia da fabricação dos queijos. Os queijos e o exsudado dos mesmos foram analisados para contagem de *Pseudomonas* spp., micro-organismos proteolíticos e de bacteriófagos nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a 10 °C.

Os queijos Minas Frescal foram elaborados em condições laboratoriais com leite previamente padronizado a 3,2 % de gordura e pasteurizado a 65 °C por 30 min. Após a fabricação, os queijos foram acondicionados em embalagens de polietileno de baixa densidade estéreis e mantidos sob refrigeração (10 °C) (Figura 5).

A Figura 4 representa o fluxograma do processamento e elaboração dos queijos Minas Frescal em escala laboratorial.

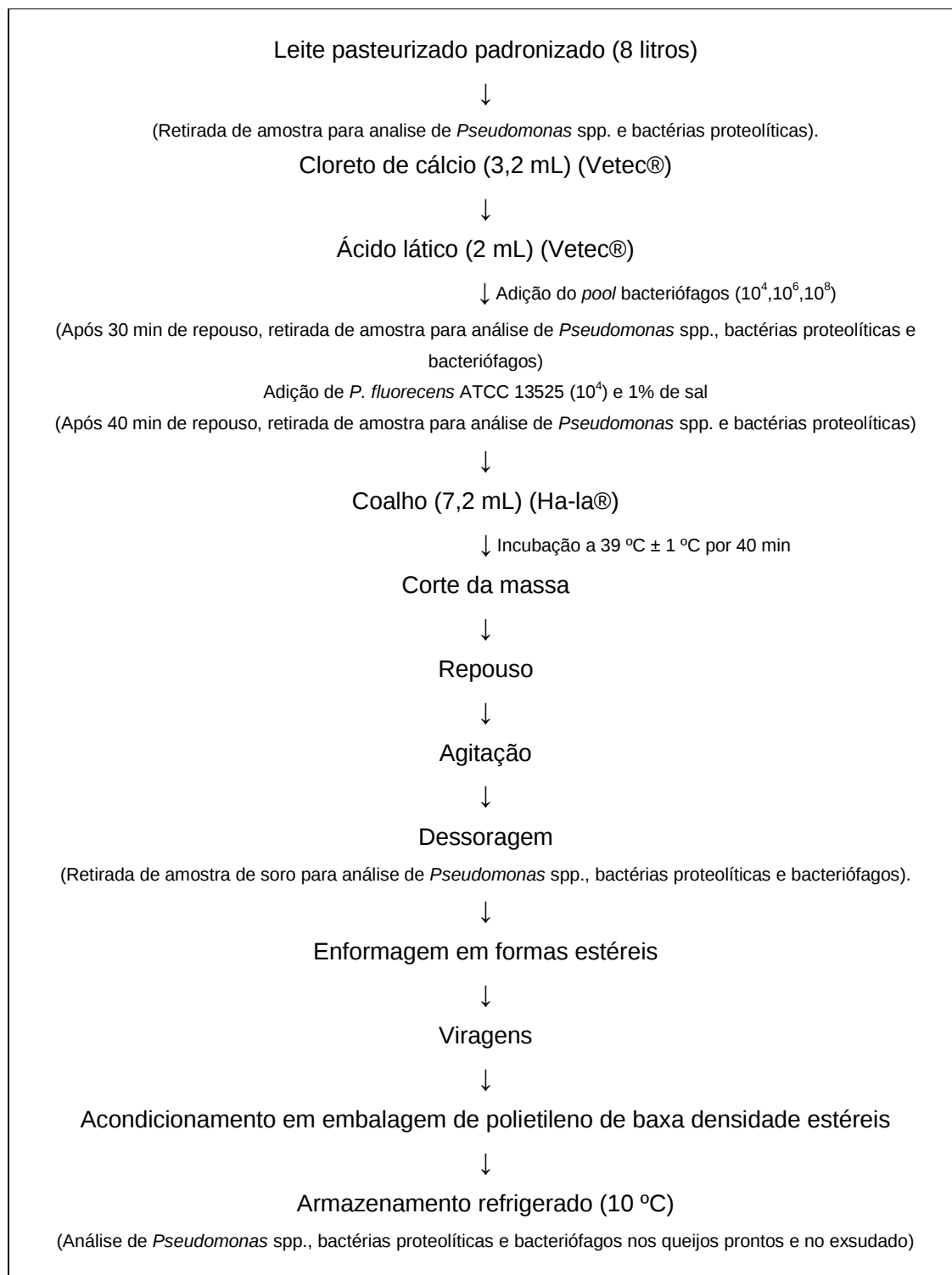
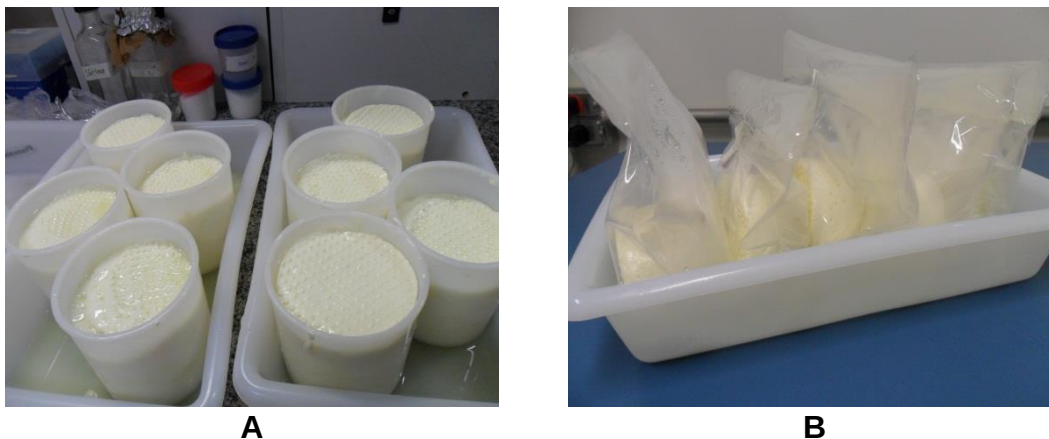


Figura 4. Fluxograma das etapas de fabricação do queijo Minas Frescal.



Figuras 5. Queijo Minas Frescal após a fabricação.

A: enformados; B: embalados pra estocagem sob refrigeração.

6.2.1. Quantificação de *Pseudomonas* spp.

Para o isolamento de *Pseudomonas* spp. dos diferentes tratamentos foi utilizada a metodologia adaptada descrita no método ISO 11059:2009 (SILVA et al. 2010). Os queijos foram retirados assepticamente de sua embalagem original, porcionados aleatoriamente até se obter 25 g do produto aos quais, posteriormente foram adicionado 225 mL de água peptonada tamponada (Himedia®) 0,1 %. As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador (Marconi, MA 440) por 3 min seguido de plaqueamento em duplicata pelo método *spread plate* em meio de cultura ágar cetrimide (Himedia®). Procedeu-se a incubação a 30 °C por 48 horas. Após este período, procedeu-se a contagem das colônias típicas isoladas e o cálculo foi efetuado pelo número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

6.2.2. Avaliação de micro-organismos proteolíticos

Os queijos foram analisados de acordo com a metodologia descrita por (MARSHALL, 1992). Os queijos foram retirados assepticamente de sua embalagem original porcionados aleatoriamente até se obter 25 g do produto aos quais, posteriormente foram adicionado 225 mL de água peptonada (Himedia®) 0,1 % e homogeneizadas por 3 minutos seguido de plaqueamento das diluições selecionadas pelo método *pour plate* em meio ágar leite (ágar para contagem padrão PCA (Difco®) acrescido de 10 % de leite em pó desnatado (Molico®) reconstituído esterilizado (10 g de leite em pó desnatado (Molico®) em 100 mL de água destilada) e incubadas a 21 °C durante 72 h. A contagem foi efetuada pelo

aparecimento de halo transparente ao redor da colônia e o cálculo efetuado pelo número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

6.2.3. Avaliação da atividade dos bacteriófagos

Na determinação da viabilidade dos bacteriófagos inoculados, 25 g de queijo com os bacteriófagos nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 PFU mL⁻¹ foram homogeneizadas em água peptonada (Himedia®) 0,1 % com auxílio do homogeneizador (Marconi, MA 440). Dessa mistura, foram retiradas 10 mL e posteriormente centrifugadas (*Eppendorf*, 5804R) a 3000 x g a 4 °C por 20 min. A suspensão foi incubada por 5 min com a cultura de *P. fluorescens* (ATCC 13525) previamente incubada a 30 °C por 16 - 18 h. Em seguida, foram adicionados 5 mL de ágar sobreccamada (TSA_s). Essa mistura foi vertida em placas contendo ágar base (TSA_b) e incubadas a 30 °C por 16 - 18 h. Após este período, procedeu-se a contagem do número de placas de lise e foi calculado o título de bacteriófagos em PFU mL⁻¹.

6.3. Análises físico-químicas dos queijos elaborados

As análises físico-químicas foram realizadas no queijo com o objetivo de avaliar o teor de sal, variação de pH e perda de massa durante o tempo de estocagem dos queijos sob refrigeração (10 °C por 21 dias).

6.3.1. Quantificação do teor de sal

A quantificação de sal nos queijos elaborados foi realizada por estimativa pelo método de Mohr adaptado, descrito pelo IAL (2008) obtendo-se por volumetria a quantificação de cloretos presente na amostra. Em um erlemeyer, contendo 100 mL de água destilada a 30 °C, foram homogeneizados 5 g de queijo retirada de forma aleatória. Em seguida acrescentou-se 2 mL de cromato de potássio (Vetec®) 5 % (v/v). Após homogeneização, foi realizada a titulação com nitrato de prata (Sigma Aldrich®) 0,1 molL⁻¹ até a viragem de cor do indicador (amarelo para vermelho-tijolo). A porcentagem de cloretos foi calculada segundo fórmula abaixo:

$$\% \text{ cloreto (m/m)} = \frac{V_{\text{Ag}_2\text{NO}_3} \times F_{\text{C Ag}_2\text{NO}_3} \times 0,584}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

Em que:

$V_{Ag_2NO_3}$ é o volume da solução de nitrato de prata gasto na titulação (mL) e $FC_{Ag_2NO_3}$ é o fator de correção da solução de nitrato de prata.

6.3.2. Medida de pH e variação de massa dos queijos

Foram realizadas a medida de pH (Tecnopon, MPA-210P) pelo método potenciométrico com a inserção do eletrodo diretamente no queijo a ser analisado e a pesagem dos queijos (Marte Slim, M2K) para verificar possíveis alterações decorrentes durante o tempo de estocagem (BRASIL, 2006).

Os queijos foram avaliados em relação à variação na massa durante a estocagem sob refrigeração a 10 °C. A variação na massa foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Variação de massa} = \frac{P_{\text{massa inicial (g)}} - P_{\text{massa final (g)}}}{P_{\text{massa inicial (g)}}} \times 100$$

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Caracterização das estirpes bacterianas isoladas de queijos Minas Frescal do comércio varejista.

7.1.1. Caracterização bioquímica

Na caracterização bioquímica dos isolados bacterianos (Tabela 3), foi verificado que 91,11 % (41 estirpes), apresentaram resultados positivos na prova do citrato de Simmon's e 8,89 % (4 estirpes) apresentaram resultados negativos. O resultado positivo está relacionado à utilização de citrato pelas bactérias como a única fonte de carbono provocando o aumento do pH, conferindo a mudança de coloração de verde para azul. Para resultados negativos, a coloração do meio é inalterada (FORTES, 2008).

Na prova da oxidase, 73,33 % (33 estirpes) apresentaram resultados positivos exibindo coloração violeta, indicando a produção de citocromo oxidase e 26,67 % (12 estirpes) apresentaram resultado negativo.

A capacidade de decomposição do peróxido de hidrogênio foi observada em 100 % das estirpes isoladas pelo teste de catalase. Estas estirpes se caracterizam pela capacidade de produzir a enzima catalase. Micro-organismos que não possuem a catalase não é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio, consequentemente, o seu crescimento fica restringido (SILVA et al. 2010).

Foi verificado na prova do indol que 17,78 % (8 estirpes) apresentaram resultados positivos e 82,22 % (37 estirpes) resultados negativos. No teste de motilidade 57,78 % (26 estirpes) apresentaram resultados positivos e 42,22 % (19 estirpes) resultados negativos e no teste para verificar a capacidade de produção de H₂S, 6,67 % (3 estirpes) apresentaram resultados positivos e 93,33 % (42 estirpe) apresentaram resultados negativos. Alguns micro-organismos possuem a capacidade de degradar o triptofano em indol, além de outros produtos como o ácido pirúvico, amônia e energia (FORTES, 2008). Algumas bactérias não conseguem metabolizar o aminoácido ou então realizam a metabolização completa sem a produção do indol. Produtos de condensação coloridos (anel vermelho na superfície do ágar) pode ser verificado quando se utiliza o reagente de Kovacs para detectar a presença do indol no meio de cultura (SILVA et al. 2010). De acordo com Fortes

(2008), micro-organismos que apresentam motilidade demonstram turvação em todo meio de cultivo e micro-organismos que não possuem motilidade crescem apenas ao longo do local de inoculação. A produção de H₂S é visualizada pela coloração escura do local de inoculação da bactéria. Isso ocorre devido à capacidade do micro-organismo de produzir ácido sulfúrico que se conjuga com os sais de metais como ferro e bismuto presentes no meio de cultura dando origem ao sulfureto de ferro que, devido a sua insolubilidade, precipita.

Na visualização microscópica com objetiva de imersão, foi observado pelo perfil morfológico que 100 % (45 estirpes) apresentaram a forma de bacilos. Através da coloração de Gram pela diferenciação tintorial, foi verificado que 88,89 % (40 estirpes) apresentaram-se como Gram negativas e 11,11 % (5 estirpes) como Gram positivas exibindo colorações vermelha e roxa respectivamente.

Tabela 3. Resultados dos testes bioquímicos realizados com as estirpes bacterianas isoladas de queijos Minas Frescal adquiridos no comércio varejista.

	Citrato	Oxidase	Catalase	Indol	Motilidade	H ₂ S	Gram
Mip01	+	+	+	-	-	-	-
Mip02	+	+	+	-	+	-	-
Mip03	+	+	+	-	+	-	-
Mip04	+	-	+	+	+	+	-
Mip05	-	+	+	-	+	-	-
Mip06	+	+	+	-	+	-	-
Mip07	+	-	+	-	+	+	-
Mip08	+	+	+	-	-	-	+
Mip09	+	+	+	-	-	-	-
Mip10	+	+	+	-	+	-	+
Mip11	+	+	+	-	+	-	-
Mip12	+	-	+	-	+	-	-
Mip13	+	+	+	-	+	-	-
Mip14	+	-	+	-	+	-	-
Mip15	+	-	+	-	-	-	-
Mip16	+	+	+	-	+	-	-
Mip17	+	-	+	-	+	-	-
Mip18	+	+	+	-	+	-	-
Mip19	-	-	+	-	+	-	-
Mip20	+	+	+	-	+	-	-

Tabela 3. (cont.)

Mip21	+	+	+	-	-	-	-
Mip22	+	+	+	-	-	-	-
Mip23	+	+	+	-	-	-	+
Mip24	+	+	+	+	+	-	-
Mip25	+	-	+	-	-	-	-
Mip26	+	-	+	-	-	-	-
Mip27	+	+	+	+	+	-	-
Mip28	+	+	+	+	+	-	-
Mip29	+	+	+	+	+	-	-
Mip30	-	+	+	+	+	-	-
Mip31	+	+	+	-	-	-	-
Mip32	+	+	+	-	-	-	-
Mip33	+	+	+	-	-	-	-
Mip34	+	+	+	-	-	-	-
Mip35	+	+	+	+	+	-	-
Mip36	+	+	+	-	-	-	-
Mip37	-	+	+	-	-	-	-
Mip38	+	+	+	+	+	-	-
Mip39	+	-	+	-	-	-	-
Mip40	+	+	+	-	+	-	-
Mip41	+	+	+	-	+	+	+
Mip42	+	+	+	-	-	-	-
Mip43	+	+	+	-	-	-	-
Mip44	+	-	+	-	+	-	+
Mip45	+	-	+	-	-	-	-

A caracterização bioquímica dos micro-organismos é um procedimento preliminar no isolamento e identificação de micro-organismos que podem estar vinculados aos alimentos. Os resultados dos testes bioquímicos indicaram que a maioria das estirpes bacterianas isoladas podem pertencer ao gênero *Pseudomonas* spp. devido às características presuntivas do gênero *Pseudomonas* observadas. Entretanto, não é uma análise conclusiva, pois informações genéticas devem estar associadas para a identificação completa do micro-organismo.

7.1.2. Caracterização molecular

Das 30 estirpes bacterianas isoladas com perfil bioquímico compatível para *Pseudomonas* (Tabela 4), 46,67 % (14 estirpes) foram confirmadas pela amplificação dos fragmentos da região 16S como típicas do gênero *Pseudomonas* quando comparadas ao controle positivo (Figura 6). O produto da amplificação mensurado no *software* Quantum ST4 foi de aproximadamente 630 pb. Este resultado encontra-se de acordo com o esperado para a amplificação da subunidade conservada da região 16S descrita por Spilker et al. (2004).

Tabela 4. Valores dos tamanhos de pares de base de cada estirpe bacteriana confirmada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Isolados	Pares de base (pb)
Mip01	500
Mip02	493
Mip03	493
Mip07	664
Mip10	626
Mip12	632
Mip14	707
Mip15	569
Mip16	533
Mip17	636
Mip18	557
Mip19	568
Mip21	715
Mip22	606
Mip23	564
Mip26	573
Mip27	619
Mip28	622
Mip29	634
Mip30	638
Mip32	753
Mip33	591
Mip34	622
Mip35	491
Mip37	605
Mip40	576
Mip41	619
Mip43	592
Mip44	629
Mip46	629

Resultados semelhantes foram encontrados por Ghosh et al. (2011) por PCR duplex. Para este mesmo gênero, estes autores observaram produto de amplificação de aproximadamente 630 pb utilizando o mesmo primer.

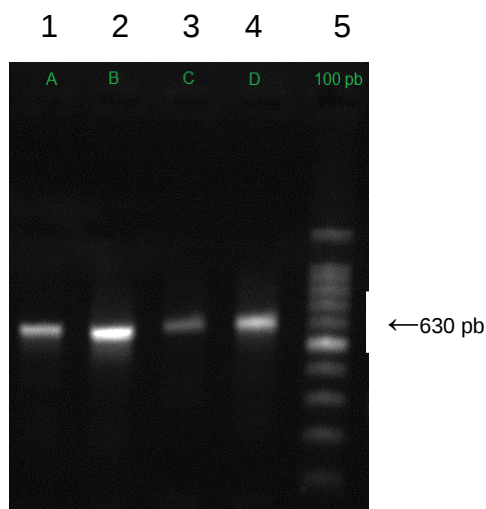


Figura 6. Produto de amplificação do gene 16S rDNA de *Pseudomonas* spp. através da técnica de PCR. Controle positivo. Linha 1 A- *P. alcaligenes* . Linha 2 B- *P. putida*. Linha 3 C- *P. aeruginosa* . Linha 4 D- *P. fluorescens*. Linha 5: marcador de peso molecular 100 pb.

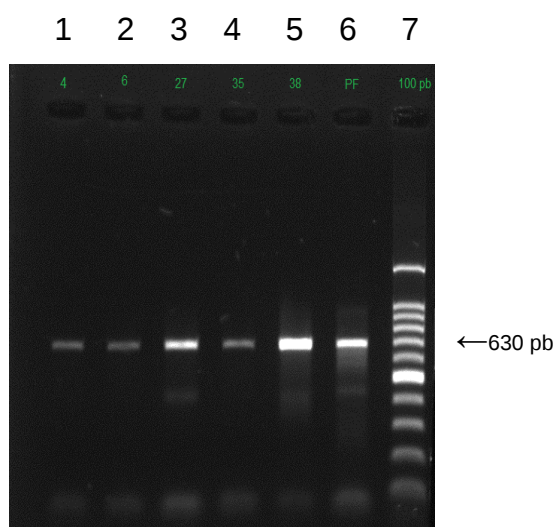


Figura 7. Identificação molecular de isolados bacterianos de queijos Minas Frescal do comércio varejista. A - Identificação molecular do gênero *Pseudomonas* spp. pela amplificação do gene na região 16S, linha 1-5 isolados bacterianos, linha 6 controle positivo *P. fluorescens* ATCC 13525, linha 7 marcador de peso molecular 100 pb.

A elevada ocorrência de *Pseudomonas* spp. em queijos Minas Frescal do comércio varejista demonstra deficiência durante a fabricação desse produto. Esta contaminação pode ser resultante durante o processamento e pós processamento associado à práticas higiênico sanitárias inadequadas, armazenamento inadequado

com oscilações de temperatura. Apesar da legislação brasileira não exigir análise para verificar a presença de *Pseudomonas* spp. em alimentos, a sua detecção é de grande relevância uma vez que este gênero é o principal responsável pela deterioração em alimentos.

A identificação de *Pseudomonas* spp. neste trabalho ressalta a importância da pesquisa deste micro-organismo em alimentos. No entanto, é importante a caracterização deste micro-organismo uma vez que dentro deste gênero pode haver, além de espécies deterioradoras de alimentos como também espécies patogênicas.

7.2. Isolamento e purificação de bacteriófagos

A presença de bacteriófagos em ambas as fontes de isolamento foi observada a partir da visualização de placas de lise sobre a superfície de ágar sobrecamada (TSA_s) contendo a cultura ativa de *P. fluorescens* (ATCC 13525) conforme a Figura 8.



Figura 8. Placas de lise dos bacteriófagos isolados.

De acordo com a Figura 8, observa-se a formação de placas de lise bem definidas, demonstrando o potencial lítico dos bacteriófagos à *P. fluorescens* ATCC 13525.

Esse potencial lítico também foi observado em estudos realizados por Gouvêia et al. (2011), Sillankorva (2004) e Asanome et al. (2003) que trabalharam com bacteriófagos para *Pseudomonas*. Estes autores isolaram bacteriófagos de *Pseudomonas* de diferentes fontes evidenciando a atividade lítica para este micro-organismo demonstrando uma boa alternativa no biocontrole deste gênero bacteriano.

Em diversos ambientes tais como água, esgoto, fezes, solo entre outros há a possibilidade de isolamento de bacteriófagos, no entanto, é fundamental a presença do hospedeiro nesses locais (KUMARI et al. 2009; BUDZIK, 2000).

Após purificação e propagação os bacteriófagos foram estocados na concentração entre 10^{10} e 10^{11} PFU mL⁻¹. O bacteriófago isolado do exsudado de frango recebeu a denominação F9 e o bacteriófago isolado de água residuária F10.

7.2.1. Análise da morfologia de bacteriófagos

Observou-se por meio da microscopia eletrônica de transmissão que o bacteriófagos apresentaram morfologia semelhantes: cabeça icosaédrica e pequenas caudas conforme mostrado na Figura 9.

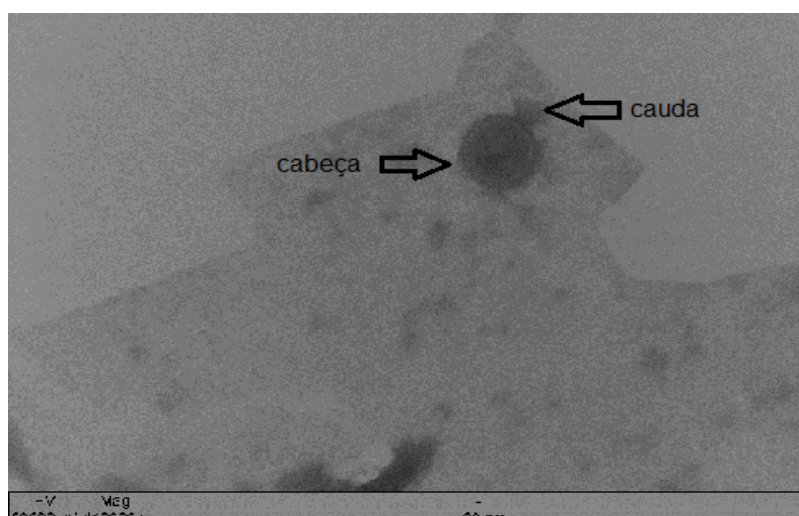


Figura 9. Observação microscópica do bacteriófago de *P. fluorescens* (ATCC 13525), obtidos de água residuária de laticínios em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140.000 x em 100 nm.

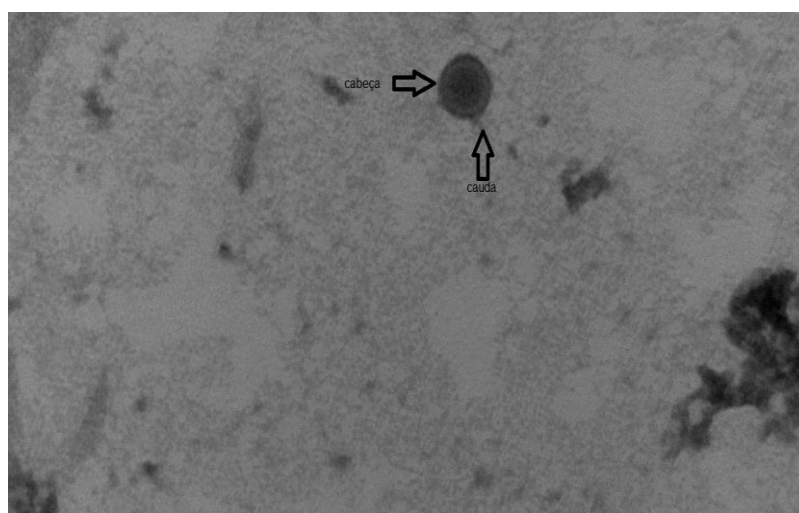


Figura 10. Observação microscópica do bacteriófago de *P. fluorescens* (ATCC 13525), obtido de exsudado de frango congelado em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140.000 x em 100 nm.

De acordo com a consistência dos dados, ambos os bacteriófagos podem ser classificados como pertencente à ordem dos *Caudovirales* e família *Podoviridae*, caracterizando-se por apresentarem cabeça icosaédrica e cauda curta.

Resultados similares foram alcançados por Kumari et al. (2009) e Sillankorva et al. (2010) ao isolar bacteriófagos de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* respectivamente de amostras de esgoto. Em ambos os estudos os os bacteriófagos eram pertencentes à família *Podoviridae* caracterizados por apresentar cabeça icosaédrica e cauda curta não contrátil.

Wichels et al. (1998) isolaram 22 bacteriófagos de amostras de água nas proximidades da ilha alemã Helgoland no Mar do Norte. Esses autores observaram que todos possuíam cabeça icosaédrica e cauda e pertenciam a três famílias diferentes: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*.

De acordo com Hagens e Lossner, (2007) a maioria dos bacteriófagos identificados atualmente pertencem à ordem *Caudovirales*, caracterizando-se pela presença de cauda curta com cabeça icosaédrica.

7.2.2. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados

Dentre as estirpes bacterianas isoladas de queijo Minas Frescal do comércio varejista, foram selecionadas 39 estirpes com perfil bioquímico compatível para *Pseudomonas*, para avaliar a atividade lítica dos bacteriófagos F9 e F10. O bacteriófago F9 apresentou atividade lítica para 48,71 % (19 estirpes) e o bacteriófago F10 apresentou atividade lítica para 25,64 % (10 estirpes) (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de especificidade com as estirpes isoladas de queijos Minas Frescal adquiridos no comércio varejista.

	F9	F10
Mip01	+	+
Mip02	-	+
Mip03	+	+
Mip04	-	-
Mip05	-	-
Mip06	-	-
Mip07	-	-
Mip08	-	+
Mip10	+	+
Mip12	+	-
Mip13	-	-
Mip14	-	-
Mip15	-	+
Mip16	+	+
Mip17	-	-
Mip18	-	-
Mip19	-	-
Mip20	-	-
Mip21	+	+
Mip22	-	-
Mip25	-	-
Mip26	-	-
Mip27	-	-
Mip28	-	-
Mip29	+	-

Tabela 5. (cont.)

Mip30	+	+
Mip31	-	-
Mip32	+	-
Mip33	+	-
Mip34	-	-
Mip35	+	-
Mip36	+	-
Mip37	+	-
Mip38	-	-
Mip39	+	-
Mip40	+	-
Mip41	+	-
Mip43	+	+
Mip44	+	-
Mip46	-	-

(-) Resultado de lise negativo; (+) Resultado de lise positivo.

Em relação à avaliação da especificidade dos bacteriófagos a diferentes gêneros e espécies bacterianas de interesse em alimentos, os bacteriófagos F9 e F10 apresentaram baixo espectro de ação entre gêneros diferentes de bactérias e amplo espectro entre espécies diferentes do mesmo gênero (Tabela 6). Das 14 estirpes testadas, o bacteriófago F9 apresentou atividade lítica para (42,86 %) e o bacteriófago F10 apresentou atividade lítica para (21,43 %). Ambos os bacteriófagos foram específicos somente para as estirpes Gram negativas, não demonstrando atividade lítica para bactérias Gram positivas.

Tabela 6. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos F9 e F10 em relação a outros gêneros e espécies de micro-organismos.

Micro-organismos	ATCC	Atividade lítica dos bacteriófagos	
		F9	F10
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	-	-
<i>Salmonella</i> Enteretides	13076	-	-
<i>Hafnia alvi</i>	11604	-	-
<i>Aeromonas hydrofila</i>	7966	-	-
<i>Escherichia coli</i>	23229	+	-
<i>Salmonella</i> Typhi	19430	-	-
<i>Salmonella</i> Cholerasius	10708	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	8100	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	7966	+	+
<i>P. alcaligenes</i>	14904	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	25619	+	+
<i>P. putida</i>	15145	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	-	-

(-) Resultado de lise negativo; (+) Resultado de lise positivo.
ATCC: American Type Culture Collection

Os bacteriófagos isolados neste estudo não apresentaram características e especificidades semelhantes, provavelmente não são pertencentes a um mesmo grupo ou linhagem.

A especificidade exibida pelos dois bacteriófagos para o gênero *Pseudomonas* se deve ao fato de ambos serem específico para este grupo, principalmente em relação ao bacteriófago F10, uma vez que a metodologia utilizada para seu isolamento houve adição de cultura ativa de *P. fluorescens* (ATCC 13525). Observa-se que o bacteriófago F9 apresentou espectro de ação mais amplo do que o bacteriófago F10, demonstrando ação lítica para outros gêneros bacterianos como *Salmonella* e *E. coli*. Devido a essa especificidade peculiar dos bacteriófagos, esse estudo sugere a possibilidade de se utilizar diferentes bacteriófagos para o biocontrole, pois ambos exibiram ação complementar o que pode potencializar a ação lítica para o micro-organismos de interesse.

Segundo Silveira et al. (2007) a possibilidade de associar mais de um bacteriófago no controle de infecções ou contaminações quando o bacteriófago apresenta baixo espectro de ação pode aumentar a capacidade de infecção da célula hospedeira e tornar o processo de infecção mais eficiente.

A atividade lítica dos bacteriófagos neste estudo restrita somente às bactérias Gram negativas possivelmente se deve a similaridade entre as estruturas da superfície da bactéria. Para Hagens e Loessner (2007); Kurter e Sulakvelidze (2005) a especificidade e reconhecimento da superfície de moléculas da bactéria estão relacionados às proteínas presentes na cauda, realizando a interação bacteriófago-hospedeiro interagindo com receptores presentes na superfície da célula bacteriana. Em bactérias Gram negativas, a interação é realizada por meio do lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana e em bactérias Gram positivas a interação é realizada através do peptídeoglicano, ácido tecóico ou lipoteicóico que se encontram na parede celular do hospedeiro.

De acordo com Albino (2011), a especificidade de bacteriófagos à bactéria de interesse é um fator importante na prevenção ou redução de micro-organismos indesejáveis demonstrando o seu potencial no controle biológico.

7.2.3. 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 (*Hae* III, *Hinf* I, *Apa* I, *Hha* I e *Hind* III). Os resultados revelaram que tanto o bacteriófago F9 (linha 2) quanto o bacteriófago F10 (linha 1) de *P. fluorescens* foram sensíveis a *Hae* III e *Hinf* I (Figura 10 e 11). Para as enzimas de restrição *Apa* I, *Hha* I e *Hind* III, os bacteriófagos não apresentaram sensibilidade.

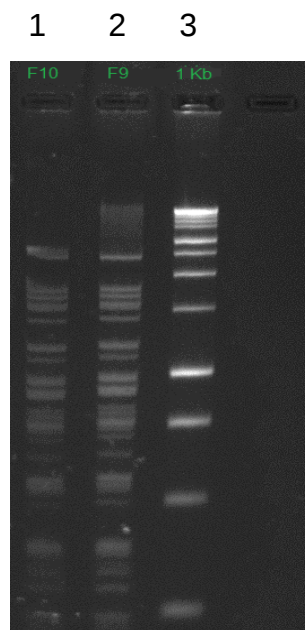


Figura 11. Identificação molecular dos bacteriófagos F9 e F10 pelo perfil de polimorfismo (enzima *Hae* III). Linha 1 bacteriófago isolado de exsudado de frangos congelados. Linha 2 bacteriófago isolado de água residuária de laticínios. Linha 3 marcador de peso molecular 1 kb.

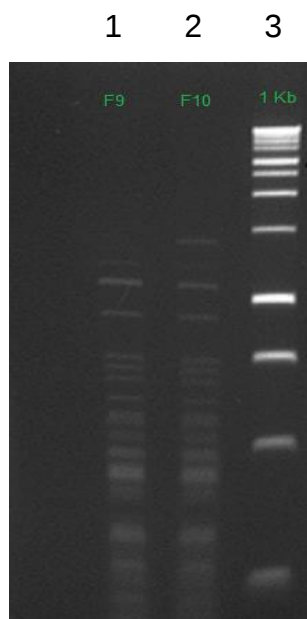


Figura 12. Identificação molecular dos bacteriófagos F9 e F10 pelo perfil de polimorfismo (enzima *Hinf* I). Linha 1 bacteriófago isolado de exsudado de frangos congelados. Linha 2 bacteriófago isolado de água residuária de laticínios. Linha 3 marcador de peso molecular 1 kb.

Para as enzimas utilizadas, não foi possível detectar diferenças no perfil genômico dos bacteriófagos. Na verificação do perfil genômico de bacteriófagos de *Pseudomonas*, Kumari et al. (2009) observaram resultados diferentes ao verificar que todos os bacteriófagos exibiram diferentes padrões de bandas quando

submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Hinf* I e *BsuR* I, confirmando que eram geneticamente diferentes.

8. Avaliação microbiológica dos queijos elaborados

Foram realizadas análises do leite antes da adição dos ingredientes e inóculos de bactérias e bacteriófagos em todos os tratamentos. Também foram analisados os leites com adição de bactéria e dos bacteriófagos para verificar a presença da concentração desses no leite nas concentrações determinadas neste estudo (Tabela 7).

Tabela 7. Quantificação de *Pseudomonas* spp. e micro-organismos proteolíticos expresso em log UFC mL⁻¹ e de bacteriófagos expresso em log PFU mL⁻¹ no leite e no soro durante a fabricação de queijo Minas Frescal.

Tratamentos	Leite	Leite com bacteriófago	Leite com bacteriófago e <i>P. fluorescens</i>	Soro
T1	nd	nd	-	-
T2	nd	nd	-	-
T3	<i>Pseudomonas</i> spp.	nd	3,46	3,44
T4	nd	nd	3,98	3,34
T5	nd	nd	4,27	3,89
T1	nd	nd	-	-
T2	nd	nd	-	-
T3	Proteolíticos	nd	3,58	3,52
T4	nd	nd	4,43	3,60
T5	nd	nd	4,62	3,64
T1	nd	-	-	-
T2	nd	-	-	-
T3	Bacteriófagos	4,76	4,52	3,37
T4	nd	7,41	7,12	4,75
T5	nd	8,37	8,15	7,31

T1: Queijo sem inóculo (controle negativo); T2 Queijo com *P. fluorescens* (10⁴) (controle positivo); T3: Queijo + *P. fluorescens* (10⁴) + bacteriófago (10⁴); T4: Queijo + *P. fluorescens* (10⁴) + bacteriófago (10⁶); T5: Queijo + *P. fluorescens* (10⁴) + bacteriófago (10⁸).

nd: não detectado

A partir dos resultados, observou-se que não houve presença de *Pseudomonas* spp. no leite utilizado para fabricação dos queijos, indicando que o leite estava dentro dos padrões de qualidade e ausência deste micro-organismo quando inoculado o bacteriófago no leite nas concentrações 10⁴, 10⁶ e 10⁸ PFU mL⁻¹.

¹. De acordo com a Tabela 7, houve pequena variação na contagem de *Pseudomonas* spp. quando inoculada juntamente com o bacteriófago nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 PFU mL⁻¹. Nesta avaliação, verifica-se que o sal não inibiu a multiplicação bacteriana, o que era esperado uma vez que os micro-organismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp. são halotolerantes. Após a desoragem, observou-se que houve presença de *Pseudomonas* spp. no entanto, em quantidade menor do que o encontrado no leite inoculado.

Quanto aos micro-organismos proteolíticos, observa-se na Tabela 7 que também não houve presença de bactérias proteolíticas leite utilizado para fabricação dos queijos, no entanto, a contagem foi ligeiramente mais alta em comparação à *Pseudomonas* spp. Salienta-se que, além do gênero *Pseudomonas* diversos outros gêneros microbianos proteolíticos podem estar presentes no leite. No soro, também observou-se presença de micro-organismos proteolíticos, no entanto, em menor quantidade em comparação ao leite inoculado e numa quantidade ligeiramente maior em comparação ao soro analisado para *Pseudomonas* spp..

Em relação à contagem de bacteriófagos no leite, verificou-se que a viabilidade manteve-se estável, no entanto, observa-se que houve uma pequena redução na contagem dos bacteriófagos na presença da bactéria. No soro, foi observada menor contagem de bacteriófagos, indicando que maior quantidade do vírus manteve-se no queijo.

Durante o tempo de armazenamento dos queijos Minas Frescal, foi detectado diferença significativa nos valores médios da contagem de *Pseudomonas* spp. ao nível 5 % de significância pelo teste de Tukey entre os tratamentos (Tabela 8). Observou-se, no presente estudo, a redução na população de *Pseudomonas* spp. na presença dos bacteriófagos na concentração 10^4 PFU. mL⁻¹, demonstrando que o tratamento T3 apresentou efeito no controle da multiplicação desses micro-organismos nos queijos comparado aos demais tratamentos (Figura 13).

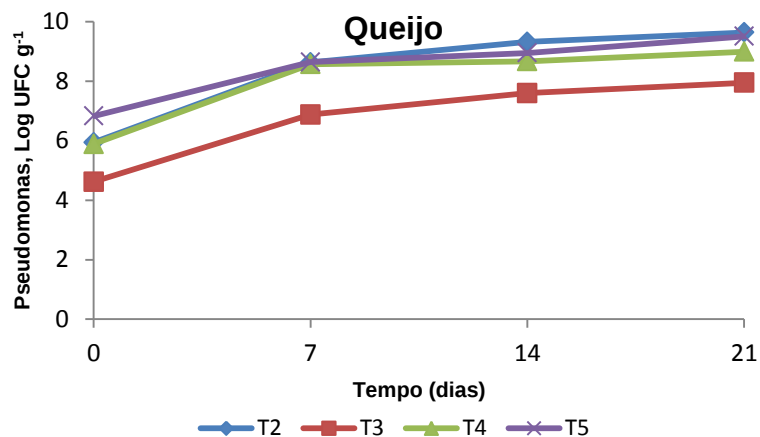


Figura 13. Variação da contagem de *Pseudomonas* spp. (Log UFC g⁻¹) nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

Na avaliação microbiológica dos exsudados dos queijos, foi observada variação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Baseado nos valores médios da contagem de *Pseudomonas* spp., verificou-se que o tratamento T3 demonstrou efeito no controle da multiplicação de *Pseudomonas* no exsudado dos queijos em relação aos demais tratamentos (Figura 14).

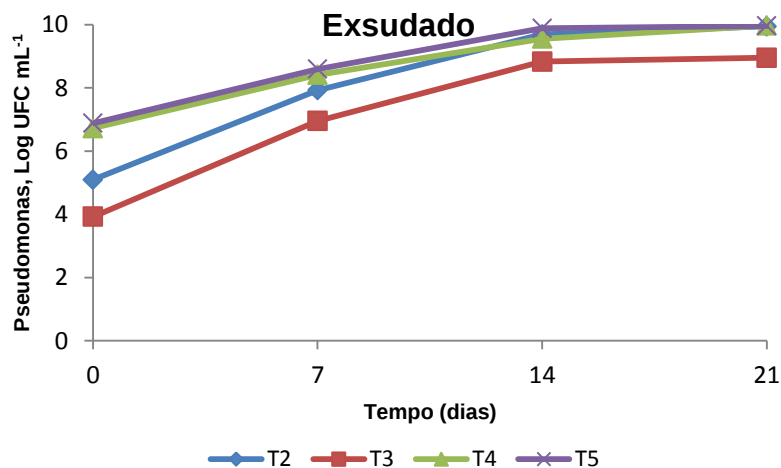


Figura 14. Variação da contagem de *Pseudomonas* spp. (Log UFC mL⁻¹) no exsudado dos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

Neste estudo, o tratamento T1 (controle) não foi avaliado estatisticamente, devido à contaminação microbiológica ambiental.

Tabela 8. Valores médios da contagem de *Pseudomonas* spp., proteolíticos e bacteriófagos em queijos Minas Frescal e no exsudado estocados por 21 dias sob refrigeração (10 °C).

Amostra	Tratamentos	<i>Pseudomonas</i> spp. (Log UFC g ⁻¹)	Proteolíticos (Log UFC g ⁻¹)	Bacteriófagos (PFU g ⁻¹)
Queijo	T2	8,26 ^a	8,17 ^a	-
	T3	6,74 ^b	7,23 ^b	4,26 ^c
	T4	8,00 ^c	7,81 ^c	6,37 ^b
	T5	8,46 ^d	7,80 ^c	8,14 ^a
Exsudado	T2	8,14 ^a	8,26 ^a	-
	T3	7,14 ^b	7,57 ^b	2,95 ^c
	T4	8,65 ^c	8,31 ^a	4,72 ^b
	T5	8,80 ^d	8,08 ^c	7,89 ^a

T1: Queijo sem inóculo (controle negativo); T2 Queijo com *P. fluorescens* (10⁴) (controle positivo); T3: Queijo + *P. fluorescens* (10⁴) + bacteriófago (10⁴), T4: Queijo + *P. fluorescens* (10⁴) + bacteriófago (10⁶); T5: Queijo + *P. fluorescens* (10⁴) + bacteriófago (10⁸). Letras minúsculas diferentes na coluna, para cada análise físico-química e amostra, difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resultados diferentes foram observados quanto à contagem de micro-organismos proteolíticos nos queijos. Foi observado que não houve diferença significativa nos valores médios nos tratamentos T4 e T5 ($p > 0,05$) (Tabela 8). Verificou-se que a concentração de bacteriófagos 10⁻⁴ PFU mL⁻¹ referente ao tratamento T3 demonstrou-se mais eficiente na inibição da multiplicação desses micro-organismos durante o tempo de estocagem (Figura 15).

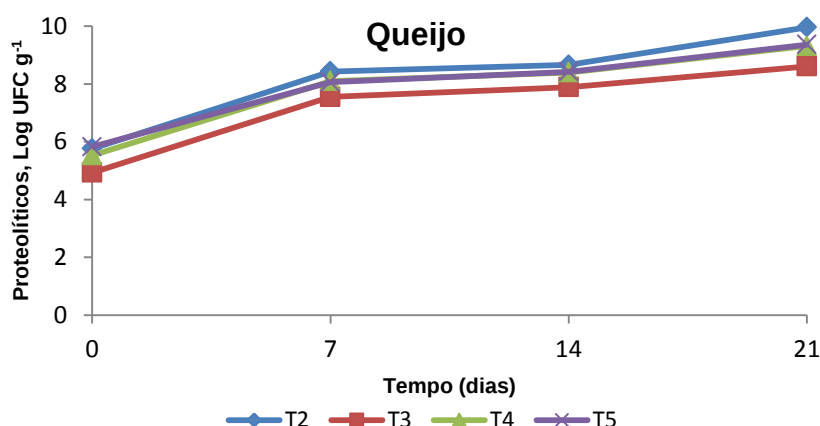


Figura 15. Variação da contagem de micro-organismos proteolíticos (Log UFC mL⁻¹) nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

Na avaliação de micro-organismos proteolíticos nos exsudados dos queijos, observou-se que não houve variação significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos T2 e T4. Baseado nos valores médios da contagem deste micro-organismos, verificou-se que o tratamento T3 apresentou efeito no controle da multiplicação de micro-organismos proteolíticos no exsudado dos queijos em comparação aos demais tratamentos (Figura 16).

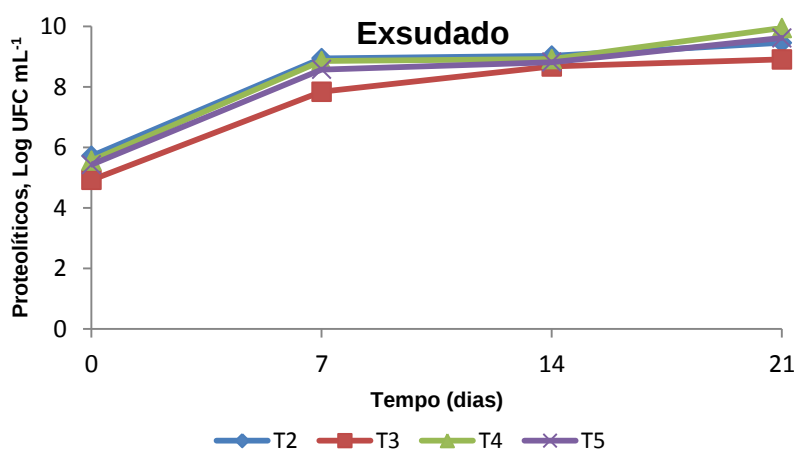


Figura 16. Variação da contagem de micro-organismos proteolíticos (Log UFC mL⁻¹) no exsudado dos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

Verificou-se neste estudo que o efeito dos bacteriófagos sobre a contagem de *Pseudomonas* spp e micro-organismos proteolíticos no queijo e no exsudado do queijo está diretamente relacionada à concentração de bacteriófagos utilizada. De acordo com Húngaro (2010) o efeito entre a concentração de bacteriófagos e a concentração de hospedeiro é denominada Multiplicidade de Infecção (MOI). Resultados diferentes foram encontrados por Sulakvelidze et al. (2001), este autores afirmam que a utilização de altas concentrações de bacteriófagos com MOIs superiores a 10.000 são mais eficientes.

A diferença na concentração da atividade lítica dos bacteriófagos ao hospedeiro pode estar associada ao tipo de micro-organismo presente. No grupo dos micro-organismos proteolíticos, além do gênero *Pseudomonas*, podem estar presentes outras bactérias psicrotróficas proteolíticas incluindo os gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Proteus*. Almeida (2010) apontou vários fatores que 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 penetrar na bactéria.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade do bacteriófago entre os tratamentos T3, T4, T5 ao longo do tempo de estocagem dos queijos, tanto no queijo quanto no exsudado demonstrando que a contagem média de bacteriófagos nos queijos entre os tratamentos ao longo dos 21 dias de armazenamento não diferiu com relação à concentração inoculada no tempo inicial. Observou-se uma redução na contagem de bacteriófagos no exsudado em todos os tratamentos durante o tempo de armazenamento (Tabela 8), porém, a presença destes nos queijos pode ser verificada ao longo do período de estocagem (Figura 17 e 18).

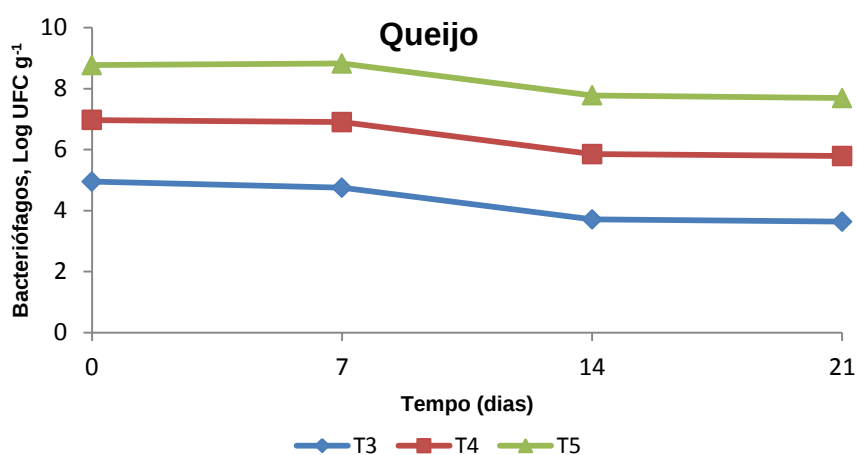


Figura 17. Variação da contagem de bacteriófagos (Log UFC g⁻¹) nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem

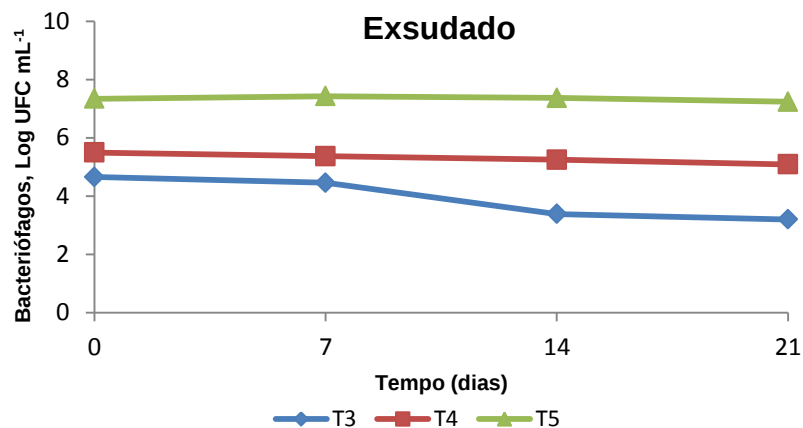


Figura 18. Variação da contagem de bacteriófagos (Log UFC mL⁻¹) no exsudado dos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

A eficácia e a estabilidade dos bacteriófagos está diretamente relacionada a aspectos ambientais (RAGHU, 2011). 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 os bacteriófagos de *Pseudomonas* spp. (wy e ps1) reduziram a viabilidade em soluções altamente concentradas de NaCl. O bacteriófago ps1 mostrou uma diminuição de 99 % na viabilidade, enquanto que a viabilidade do bacteriófago wy foi reduzida em apenas 26 %. Suspensões de 10⁻⁸ PFU.mL⁻¹ de bacteriófagos de *Pseudomonas* spp. (wy e ps1) diluídas em tampão fosfato foram testadas durante 1 hora em pH entre 3 e 7. Esses autores ainda salientaram que o pH exerceu influência sobre os bacteriófagos em valores menores ou igual a 5.

Sousa (2012) ressaltou 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.

9. Avaliação físico química dos queijos elaborados

Neste estudo, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de pH entre os tratamentos durante o tempo de estocagem dos queijos sob refrigeração (Tabela 9; Figura 19).

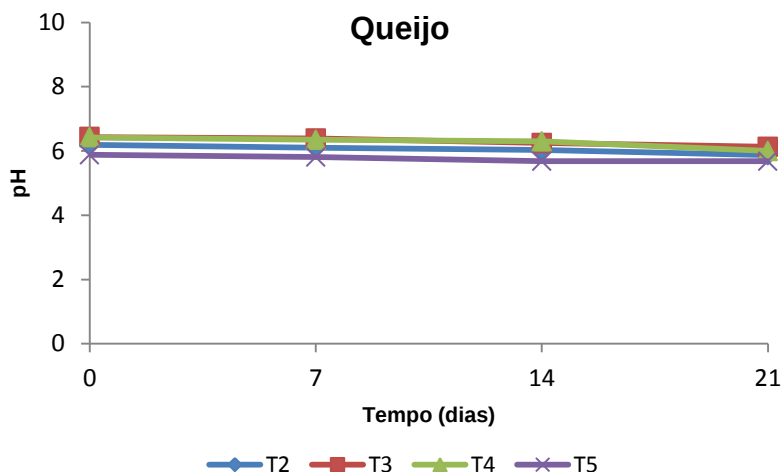


Figura 19. Média dos valores de pH nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

Na avaliação físico química dos queijos, o tratamento T1 (controle) não foi avaliado estatisticamente, pois houve contaminação microbiológica ambiental.

Tabela 9. Valores médios do pH, cloretos e perda de massa em amostras de queijos estocados por 21 dias

Tratamentos	pH	Cloretos (% m/m)	Perda de massa (%)
T2	6,05 ^a	1,21 ^a	0,15 ^a
T3	6,30 ^a	1,10 ^a	0,15 ^a
T4	6,27 ^a	1,15 ^a	0,18 ^a
T5	5,76 ^a	1,18 ^a	0,24 ^a

T1: Queijo sem inóculo (controle negativo); T2: Queijo com *P. fluorescens* (10^4) (controle positivo); T3: Queijo + *P. fluorescens* (10^4) + bacteriófago (10^6); T4: Queijo + *P. fluorescens* (10^4) + bacteriófago (10^6); T5: Queijo + *P. fluorescens* (10^4) + bacteriófago (10^6). Letras minúsculas diferentes na coluna, para cada análise físico-química e amostra, difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em um estudo realizado por Sangaletti et al. (2009) na avaliação da vida útil de queijos Minas Frescal sob refrigeração, foi observado redução nos valores de pH de 6,66 a 5,85 entre o 1º e o 30º dias de estocagem ao qual foi constatado o

aumento da multiplicação de micro-organismos psicrótrófos, mesófilos e bactérias lácticas durante o período de armazenamento. Segundo Fox et al. (1999) a redução do pH afeta algumas características como a sinérese do queijo, alterando a sua composição assim como a retenção de cálcio modificando diretamente a textura.

Saboya et al. (1998) verificaram que não houve variação significativa ($p>0,01$) no pH de queijos Minas Frescal adicionado de 10, 20 e 40 % de leite reconstituído a partir de leite em pó integral estocados durante 21 dias a 8 °C sendo os resultados semelhantes à literatura de queijo Minas Frescal fabricado pelo método tradicional. Andreatta (2006) verificou que houve pouca variação de pH (6,74 a 6,71) em queijos de alta umidade estocados durante 30 dias sob refrigeração. De acordo com Sangaletti (2007) o pH é um parâmetro fundamental na avaliação da deterioração e consequentemente na estimativa da sua vida de prateleira.

A quantificação de sal nos queijos foi realizada por estimativa pela quantificação de cloretos em porcentagem. Com relação aos teores de cloretos dos queijos Minas Frescal, constatou-se que durante o tempo de estocagem, não houve variação significativa entre os tratamentos ($p> 0,05$) (Tabela 9; Figura 20).

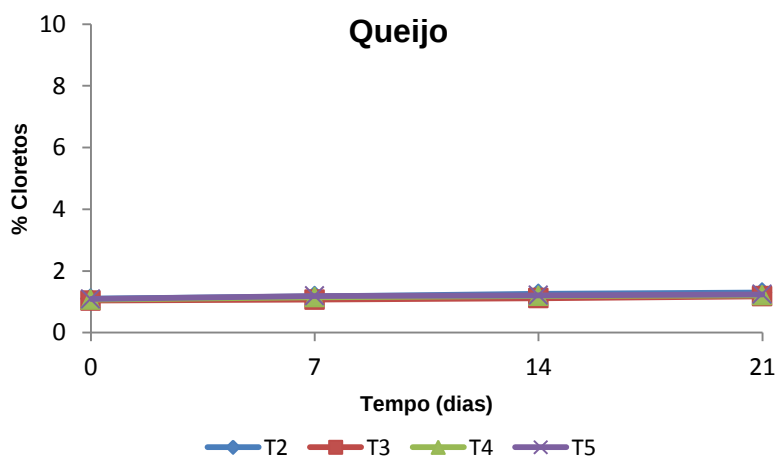


Figura 20. Média dos valores de porcentagem de cloretos nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

Pelo fato do queijo Minas Frescal ser um queijo fresco, de alta umidade e não prensado, observou-se que durante o período de estocagem sob refrigeração, houve perda de exsudado ao qual este ficou retido na embalagem do produto. Devido à exsudação, ocorreu maior concentração de sólidos solúveis na massa. Perry (2004)

e Sbampato et al. (2000), ressaltaram que durante o armazenamento do queijo, ocorre perda parcial de umidade juntamente com as proteínas do soro, ácido lático e minerais. Em razão da diferença de pressão osmótica, ocorre a absorção do NaCl na massa e consequentemente o aumento no teor de sal do queijo.

Furtado (2005) informou diversas características intrínsecas a este produto que podem contribuir para a exsudação, como o tamanho do corte da coalhada, que promove a retenção de maior umidade; período curto de fabricação, ausência de prensagem, além de ser imediatamente embalado e comercializado em curto período de tempo após ser fabricado. De acordo com Paula et al. (2009) outro fator que é alterado devido a sinérese é o pH, uma vez que um baixo pH promove o aumento da liberação do soro.

Durante o tempo de estocagem, também se observou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na perda de massa entre os tratamentos ao longo do tempo de estocagem (Tabela 9; Figura 21).

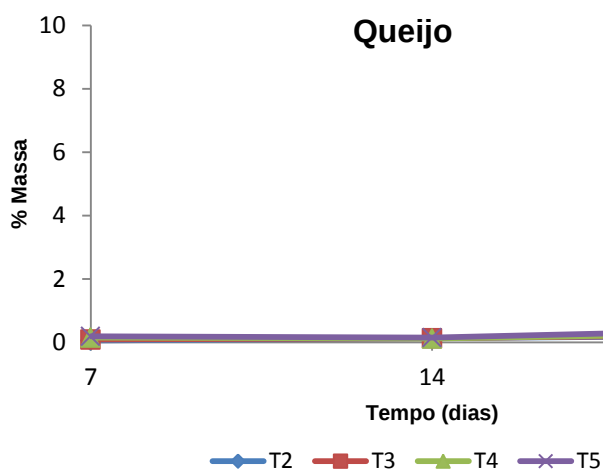


Figura 21. Média dos valores de porcentagem de massa nos queijos Minas Frescal em função do tempo de estocagem.

A perda de massa dificilmente ocorre em queijos frescos, uma vez que o consumo deste produto é imediato. Porém, neste estudo, os queijos Minas Frescal permaneceram estocados sob refrigeração durante 21 dias, ao qual foi possível verificar uma pequena variação de massa em todos os tratamentos.

Normalmente essas alterações ocorrem em queijos maturados, evidenciando diversas modificações químicas, físicas e microbiológicas que alteram os

constituintes do queijo (SBAMPATO et al. 2000). Mata (2009) observou reduções significativas na redução de massa e volume em queijos Minas artesanal antes e após 60 dias, maturados à temperatura ambiente. Resultados similares foram encontrados por Martins (2006) em queijos maturados sob temperatura de refrigeração embalada a vácuo e em queijos maturados em temperatura ambiente isentos de embalagem.

10. CONCLUSÃO

Foi possível o isolamento de bacteriófagos líticos para *Pseudomonas* spp. em amostras de água residuária de laticínios e exsudado de frangos congelados, a multiplicação na célula hospedeira em condições laboratoriais e alcançar concentrações elevadas pelas metodologias utilizadas. Os dois bacteriófagos isolados para utilização em biocontrole não demonstraram diferenças no perfil genômico pela análise de restrição com as enzimas *Hae* III e *Hinf* I, exibiram morfologias semelhantes e expressaram baixo espectro de ação para gêneros diferentes de bactérias e amplo espectro entre espécies diferentes do mesmo gênero.

Pelos testes bioquímicos e moleculares realizados nas estirpes bacterianas isoladas de queijos Minas Frescal adquiridas do comércio varejista em distintas épocas e regiões, constatou-se que 46,67 % das estirpes eram pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp.

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre os tratamentos no controle da multiplicação de *Pseudomonas* e bactérias proteolíticas. A eficácia do biocontrole com bacteriófagos na redução desses micro-organismos em queijos Minas Frescal apresentou-se dependente da concentração de bacteriófagos utilizada, mostrando-se efetiva na concentração 10^4 PFU g⁻¹. A contagem de bacteriófagos durante o tempo de armazenamento reduziu, porém, a presença dos fagos nos queijos continuou durante o período de estocagem sob refrigeração.

Foi verificado, durante o tempo de estocagem, que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no pH, no percentual de cloretos e na massa dos queijos Minas Frescal entre os tratamentos deste estudo.

Portanto, o uso de bacteriófagos líticos apresenta-se como uma alternativa com grande potencial para o controle biológico de *Pseudomonas* e micro-organismos proteolíticos aumentando a vida útil de queijo Minas Frescal.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **O consumo de queijos aumenta no inverno.** São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1005&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17> Acesso em 11/02/2013.

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Queijos – Mercado total brasileiro.** Compilado e organizado por Disney Criscione, São Paulo, 2012.

ACURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.F.R.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2250 – 2255, 2008.

ALBINO, L.A.A. **Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella Typhimurium*.** 75 p. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG. 2011.

ALVES, C.C.C. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico.** 2010. 79 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ, 2010.

ASANOME, W.; PEREIRA, C.R.; GOMES, M.J.P. **Isolamento de bacteriófagos com atividade lítica em bactérias de importância veterinária.** In: XV Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre, RS. 2003. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/39911?locale=en>>. Acesso em 14/02/2013.

ATTERBURY, R.J.; DILLON, E.; SWIFT, C.; CONNERTON, P.L.; FROST, J.A.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4885–4887, 2005.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 3, p.1-20, 2004.

BIELKE, L.S; HIGGINS, A.M; DONOGHUE, D.J; DONOGH, U.E. & HARGIS, B. *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. **Journal of Poultry Science**, v. 86, p. 2536-2540, 2007a.

BRASIL, Ministério do Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996, Seção I, p. 3977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos - DINAL. Padrões microbiológicos para produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p.21005-21012, 22 de setembro de 1997a, Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 326 de 31 de julho de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico - sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores / industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**. 01 de agosto de 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do leite e produtos lácteos. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. Seção 1, p.19684, 1997c.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. Portaria nº 46, de 10/02/98. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção I, p. 24, 16 mar. 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº44. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 mar, Seção 1, p. 5, 2004.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Tabela 1 – Produção e vendas dos produtos e/ou serviços industriais, segundo as classes de atividades e a descrição dos produtos – Brasil – 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto2009/tabelas_pdf/Tabela1.pdf>. Acesso em 11/02/2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico – Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2006.

BREITBART, M.; HEWSON, I.; FELTS, B.; MAHAFFY, J.M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; ROHWER, F. Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 20, p. 6220 – 6223, 2003.

BRUSSOW, H. Phage therapy: the Escherichia coli experience. **Microbiology**, v. 151, p. 2133 – 2140, 2005.

BRUSSOW, H.; HENDRIX, R.W. Phage Genomics: Small Is Beautiful. **Cell**, v. 108, p. 13 – 16, 2002.

BUDZIK J. Phage Isolation and investigation. **Dartmouth Undergraduate Journal of Science**, v. 3, n. 1, p. 37 – 43, 2000.

CARRILLO, C.L.; ATTERBURY, R.J; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I.F. Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6554 – 6563, 2005.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262 – 267, 2007.

CASTILHO, M.H. **Tipos de coagulação lática - enzimática e ácida e sua utilidade na produção de queijos**. 42 p. 2008. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem animal). Universidade Castelo Branco, Goiânia GO. 2008.

CHALITA, M.A.N.; SILVA, R.O.P.; PETTI, R.H.V.; SILVA, C.R.L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no Mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, SP, v.39, n.6, jun. 2009.

CONNERTON, P.L.; TIMMS, A.R.; CONNERTON, I.F. Campylobacter bacteriophages and bacteriophage therapy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 255 – 265, 2011.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C. Psychrotrophic Microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. APHA, cap. 13, p. 159 – 166, 2001.

DAGOSTIN, J.L.A. **Avaliação de atributos microbiológicos e físico-químicos de queijo Minas Frescal elaborado a partir de leite carbonatado**. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PA, 2011.

DABROWSKA, K., SWITALA-JELEN, K., OPOLSKI, A., WEBER- ABROWSKA, GORSKI, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 7 – 13, 2005.

ELLER, M.R. **Caracterização de bacteriófagos líticos isolados de soro de queijos**. 2010. 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2010.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. **Panorama do Leite**. Ano 6, n. 74, jan 2013.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C.A.F. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n. 144, p. 49 – 56, 2006.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

FRANZETTI, L.; SCARPELLINI, M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 39 – 47, 2007.

FORTES, F.B.B. **Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade.** 53 p. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2008.

FOX, P.F.; LUCEY, J.A.; COGAN, T.M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 237-253, 1990. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399009527526?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&. Acesso em 08/03/2013.

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo.** São Paulo, Editora Globo. 297 p. 1991.

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

FURTADO, M.M. **Quesos Típicos de Latinoamérica.** São Paulo. Fonte Comunicações e editoras. 292p. 2005a.

GARCIA, P.; MARTINEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRIGUEZ, A. Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 479 – 485, 2008.

GOUVÊIA, D.M.; MENDONÇA, R.C.S.; CARVALHO, M.M. Isolamento de bacteriófagos em carcaças de frango e fezes suínas como alternativa de biocontrole na indústria alimentícia. In: **26º Congresso de Microbiologia.** Foz do Iguaçu, PR. 2011.

GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.J. Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n.1, p. 93 – 100, Jan. 2009.

GUIMARÃES, T.F.; CARVALHO, G.L.; CARNEIRO, A.V.; DUARTE, M.M. Exportações mundiais de queijos: 2003 a 2007. In: 10º Minas leite. Sustentabilidade da produção de leite na agricultura familiar. **Anais.** Juiz de Fora. Embrapa Gado de Leite, 1p. 2008.

GUSSO, A.P. Salga de queijos - uma revisão. In: II Jornada Acadêmica do Curso de Tecnologia em Processos Químicos I Jornada Acadêmica do Curso de Engenharia Industrial Elétrica. **Anais do I ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica.** Paraná. Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR - Campus Toledo, p. 70-74. 2009.

HAGENS, S.; LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, n. 3, p. 513 – 519, 2007.

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

HENRIQUEZ, A.P.A.R. **Uso de bacteriófagos para controlo de *Salmonella* em avicultura**. 2008, 75p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Molecular). Universidade de Aveiro. Portugal. 2008.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; SATLEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology**. 9th ed, 787 p., 1993.

HUDSON, J.A., BILLINGTON, C., CAREY, S.G.; GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **Journal of food protection**, v.68, p. 426 – 437, 2005.

HÚNGARO, H.M. **Biocontrole de *Salmonella enterica* em pele de frango de corte**. 73p. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 2010.

IAL- Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1018p.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. Atmed, 2005.

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 01/03/2013.

JOS, H.J.; VELD, H. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 1 – 18, 1996.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Região do Campo das Vertentes é reconhecida como produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2009. Disponível em:<<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acesso em 29/04/2012.

KROPINSKI, A.M. Phage therapy – Everything old is new again. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 17, n.5, p. 297 – 306, 2006.

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**. United States of America: CRC Press, 2005. 510p.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; CAMP, M.J.; JANISIEWICZ, W.J.; ABULADZE, T.; YANG, MING.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4519 – 4526, 2003.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois Estados da região Sul**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. 2006.

MAHONY, J.; MC AULIFFE, O.; ROSS, R.P.; SINDEREN, D.V. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1 – 7, 2010.

MAHONY, J.; MC AULIFFE, O.; ROSS, R.P.; SINDEREN, D.V. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 157 – 163, 2011.

MARGESIN R.; SCHINNER F. Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychrophilic *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Biotechnology** v. 24, p. 207 – 210, 1992.

MARSHALL, R. T. Standard methods for the examination of dairy products. **American Public Health Association**, 16 ed, 1992.

MARTINEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRIGUEZ, A.; GARCÍA, P. Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v122, p. 253 – 258, 2008.

MARTINS, J. E. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro**. 129 p. 2006. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2006.

MONTEIRO, A.A.; PIRES, A.C.S.; ARAÚJO, E.A.A. **Tecnologia de Produtos Derivados de Leite**. Viçosa – MG: Editora UFV, 2007.

NEPA-UNICAMP **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Campinas: UNICAMP. 4 ed. 44p. 2011.

NETO, G.G. **Efeito da pré-incubação de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas de refrigeração sobre a hidrólise de caseína no leite desnatado pasteurizado microfiltrado**. 85 p. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2012.

NETO, R.J. **Avaliação tecnológica e físico química de queijo tipo Minas Frescal obtido a partir do leite concentrado por ultrafiltração**. 67 p. 2006. Dissertação

(Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC. 2006.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; GAUCHI, J.P.; CHAMLAGAIN, B.; ALATOSSAVA, P. Trends of Antibiotic Resistance in Mesophilic and Psychrotrophic Bacterial Populations during Cold Storage of Raw Milk. **International Scholarly Research Network**, ISRN Microbiology, 2012, 13 p.

OLIVEIRA, C.A.F; MORENO, J.F.G; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 31 – 34, 1998.

OLIVEIRA, A.; SERENO, R.; NICOLAU, A.; AZEREDO, J. The influence of the mode of administration in the dissemination of three coliphages in chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 88, p. 728 – 733, 2009a.

OLIVEIRA, G.B. **Deteção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: Interferência da atividade de proteases bacterianas**. 2009, 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Soropédia – RJ. 2009b.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009c.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**, v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAYNE, R. J. H.; JANSEN, V.A.A. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. **Journal Theoretical Biology**, v. 208, p. 37 – 48, 2001.

PALLERONI, N.J. *Pseudomonadaceae*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 1, p. 143-213, 1984.

PEIXOTO, A.M.S.; PRAÇA, E.F.; GÓIS, V.A. A potencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. **Revista Verde**, v.2, n.2, p. 52 – 64, 2007.

PEREIRA, N.F.M.C. **Atividade antifúngica de produtos naturais contra leveduras que deterioram alimentos**. 46 p. 2011. Monografia (Especialização em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG. 2011.

PETTY, N.K.; EVANS, T.J.; FINERAN, P.C.; SALMOND, G.P.C. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n.1, p. 7 – 15, 2007.

PINTO, F.A. **Metodologia da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros provenientes da fabricação de queijos Minas padrão e prato**. 2010. 45p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2010.

RIBEIRO, E.P.; SIMÕES, L.G.; JURKIEWICKZ, C.H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 19 – 23, 2009.

RICHER, R.L.; VEDAMUTHU. Milk and milk products. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. APHA, cap. 13, p. 159 – 166, 2001.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.263 – 272, 2006.

ROSOLEN, J.E. MilkPoint. **Produção de lácteos no Brasil**. Set. 2008. Disponível em:<<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/espaco-aberto/producao-de-lacteos-no-brasil-47940n.aspx>>. Acesso em: 07/02/2012.

ROSA, P. R. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico- químicas e sensoriais do queijo Minas Frescal**. 2004. 140p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba – SP, 2004.

ROSSI, L.P.R.; ALMEIDA, R.C.C. Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo. v.69, n.2. p.151 – 156, 2010.

RUSSEL, N.J. **Cold adaptation of microorganisms**. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 326, p. 595 – 611. 1990.

SABOYA, L.V.; OLIVEIRA, A.J.; FURTADO, M.M.; SPADOTI, L.M. Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 04, Campinas, out/dez, 1998.

SAMBROOK, J.;RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rded, 2001.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil de queijo Minas Frescal disponível no mercado**. 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba – SP, 2007.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Microorganismos psicrótrófos afetando a qualidade do leite**. Curso Oline: Monitoramento da Qualidade do Leite. Módulo 3. Agripoint. 2005.

SANTOS, V.A.Q.; HOFFMANN, F.L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 69, n. 1, p. 38 – 46, São Paulo, 2010.

STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of general microbiology**, v. 43, p. 159 – 271, 1966.

SILLANKORVA, S.M. **Utilização de bacteriófagos no controle de células suspensas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens***. 2004. 125p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho. Braga – Portugal. 2004.

SILLANKORVA, S.M.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. **Biofouling**, v. 26, n. 5, p. 567 – 575, 2010.

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.

SILVEIRA, R.H. **Capacidade lítica dos bacteriófagos CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4 sobre *Salmonella thyphimurium* in vitro e em suínos experimentalmente infectados**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2007.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p.5 – 14, 2006.

SOUSA, A.M. **Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas**. 61p. 2012. Monografia (Especialização em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG. 2012.

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, New York, v. 146, p. 2175 – 2182, 2002.

SPIPKER, T ; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074 – 2079, 2004.

STRAUCH, E.; HAMMERL, J.A.; HERTWIG, S. Bacteriophages: new tools for safer food? **Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit**. v.2, p.138 – 143, 2007. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/bacteriophages-new-tools-for-safer-food/#page-1>>. Acesso em: 25/01/2012.

TIM, C.D.; ROOS, T.B.; GONZALES, H.L.; OLIVEIRA, D.S. Pontos críticos de controle na pasteurização do leite em microusinas **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n.336, p.75 – 80, 2004.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2006.

VIEIRA, K.P.; LEDESMA, M.M.; ROSA, C.M.; HASSEGAWA, R.H. Contaminação de queijo Minas Frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. **Conscientiae Saúde**, v.7, n.2, p. 201 – 206, 2008.

VIEIRA, L. C.; JUNIOR, J.B.L. **Tecnologia de Fabricação do Queijo Minas Frescal**. Comunicado Técnico – EMBRAPA, dez 2004.

VINHA, M.B.; PINTO, C.L.O.; SOUZA, M.R.M.; CHAVES, J.B.P. Fatores socioeconômicos da produção de queijo minas frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, v.40, n.9, 2010.

VIZZOTTO, B.S. **Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009**. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná- UFPR. Curitiba – PR. 2009.

WICHELS, A.; BIEL, S.S.; GELDERBLOM, H.R.; BRINKHOFF, T.; MUYZER, G.; SCHU"TT, C. Bacteriophage Diversity in the North Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4128 – 4133, 1998.

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

ANEXO

Tabela 1A. Resumo da análise de variância para contagem de *Pseudomonas* spp. e proteolíticos em amostras de queijos estocados por 21 dias.

F.V	g.l	<i>Pseudomonas</i> spp.		Proteolíticos	
		QM	P > F	QM	P > F
Trat	3	7,2224	<0,0001	5,5526	<0,0001
Erro (a)	8	0,01384	<0,0001	0,06717	<0,0001
Tempo	3	24,2531	<0,0001	99,2326	<0,0001
Tempo*Trat	9	0,1801	<0,0001	0,33237	<0,0001
Erro (b)	24	0,001026	<0,0001	0,014900	<0,0001

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.
Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2A. Resumo da análise de variância para contagem de *Pseudomonas* spp. e proteolíticos em amostras de exsudado dos queijos estocados por 21 dias.

F.V	g.l	<i>Pseudomonas</i> spp.		Proteolíticos	
		QM	P > F	QM	P > F
Trat	3	20,1840	<0,0001	4,14184	<0,0001
Erro (a)	8	0,05912	<0,0001	0,07390	<0,0001
Tempo	3	125,162	<0,0001	118,556	<0,0001
Tempo*Trat	9	6,69310	<0,0001	1,03821	<0,0001
Erro (b)	24	0,00995	<0,0001	0,01250	<0,0001

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.
Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3A. Resumo da análise de variância para contagem de bacteriófagos em amostras de queijos estocados por 21 dias.

F.V	g.l	Bacteriófagos			
		Queijo		Exsudado	
		QM	P > F	QM	P > F
Trat	2	90,6262	<0,0001	150,513	<0,0001
Erro (a)	6	0,00883	<0,0001	0,01685	<0,0001
Tempo	3	9,82994	<0,0001	2,54640	<0,0001
Tempo*Trat	6	0,57505	<0,0001	10,6439	<0,0001
Erro (b)	18	0,01243	<0,0001	0,01402	<0,0001

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.
Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4A. Resumo da análise de variância para pH, cloretos e perda de massa em amostras de queijos estocados por 21 dias.

F.V	g.l	pH		Cloretos		Perda de massa	
		QM	P > F	QM	P > F	QM	P > F
Trat	3	2,44131	<0,0001	0,14914	<0,0001	0,05358	<0,0001
Erro (a)	8	0,85283	<0,0001	0,24872	<0,0001	0,00707	<0,0001
Tempo	3	0,63201	<0,0001	0,18088	<0,0001	0,57517	<0,0001
Tempo*Trat	9	0,13443	<0,0001	0,02046	<0,0001	0,04786	<0,0001
Erro (b)	24	0,42150	<0,0001	0,03048	<0,0001	0,0046	<0,0001

F.V: Fonte de variação; gl: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio.
Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.