

INFLUÊNCIA DE BACTERIÓFAGOS DE *Lactococcus lactis*
ISOLADOS DA INDÚSTRIA DE LEITE NA CAPACIDADE
ACIDIFICANTE DE FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIAIS

11/93

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INFLUÊNCIA DE BACTERÍÓFAGOS DE *Lactococcus lactis*
ISOLADOS DA INDÚSTRIA DE LEITE NA CAPACIDADE
ACIDIFICANTE DE FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIAIS

Parecer

Este exemplar corresponde a versão final da tese
defendida por Maria Raquel de Godoy Oriani e
aprovada pela Comissão Julgadora em 02/04/93.

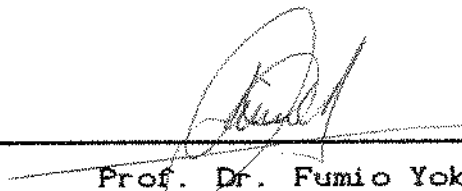
MARIA RAQUEL DE GODOY ORIANI *n/oris*



Tese apresentada à Faculdade de
de Engenharia de Alimentos para a
obtenção do título de mestre em
Ciências de Alimentos.

Orientador - Prof. Dr. FUMIO YOKOYA

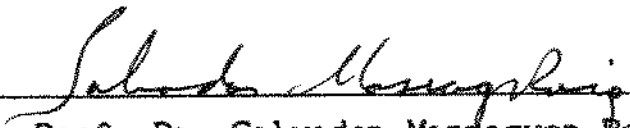
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fumio Yokoya
(orientador)

Suplente

Prof. Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa
(membro)



Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(membro)



Prof. Dr. Vanderley Perez Canhos
(membro)

Campinas, 02 de abril de 1993.

Para a minha família
Para o Lee

AGRADEÇO

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira e Ana Lourdes Gândara, pelas valiosas discussões e incentivo; e a todos do Laboratório de Leite do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela amizade.

À Sandra P. Fukuda, ao Homero e a Luciane, pela ajuda durante as coletas das amostras.

Ao ITAL, HA-LA do Brasil e BELA VISTA - Produtos Enzimáticos Ind. e Com. Ltda pela doação dos fermentos.

Aos "Maias" pelo empréstimo dos equipamentos de informática.

À Neusely da Silva e Sr. Guerino Oriani pela correção desse manuscrito.

À Cida do Departamento de Nutrição, pelo preparo do material para as análises em microscopia eletrônica.

À todos do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos que indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, bem como aos funcionários da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos, por todos os favores prestados.

À Mari e Miriam, pelo auxílio incansável durante a elaboração desse trabalho.

Ao CNPq, FAPESP e FAEP pelo auxílio financeiro.

À ABIA, pelas cópias.

À todos aqueles, cujo apoio, incentivo e compreensão foram essenciais para a elaboração e conclusão desse trabalho, dedico as palavras de Bertold Brecht para expressar minha gratidão.

*Tudo muda. De novo começar
podes, com o último alento.
O que acontece, porém, fica acontecido: e
a água que pões no vinho, não podes mais separar.*

*O que acontece, fica acontecido: a água
que pões no vinho, não podes
mais separar. Porém
tudo muda: com o último alento podes
de novo começar.*

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Índice.....	iii
Índice de Tabelas.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Resumo.....	vii
Summary.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Introdução.....	3
2.2. Bactérias lácticas.....	4
2.3. Fermentos lácticos comerciais.....	8
2.4. Bacteriófagos.....	10
2.4.1. Reprodução dos bacteriófagos.....	11
2.4.2. Caracterização dos bacteriófagos.....	16
2.4.3. Especificidade.....	19
2.5. Controle e prevenção de bacteriófagos em culturas iniciadoras.....	21
2.5.1. Meios inibidores de bacteriófagos.....	22
2.5.2. Sistema de rotação de culturas.....	23
2.5.3. Bactérias resistentes a bacteriófagos.....	24
2.5.4. Culturas concentradas.....	26
2.5.5. Sanitização.....	27
3. Material e Métodos.....	29
3.1. Material.....	29
3.1.1. Amostras.....	29
3.1.2. Microrganismos.....	29
3.1.3. Fermentos lácticos comerciais.....	30
3.1.4. Meios de cultura e soluções utilizadas.....	32
3.2. Métodos.....	34

3.2.1. Determinação da acidez titulável com hidróxido de sódio.....	34
3.2.2. Teste de inibição da produção de ácido láctico pelas culturas de <i>Lactococcus lactis</i>	34
3.2.3. Investigação da presença de bacteriófagos através da placa de lise em ágar dupla camada.....	35
3.2.4. Isolamento e estocagem dos bacteriófagos.....	35
3.2.5. Amplificação de bacteriófagos.....	36
3.2.6. Titulação de bacteriófagos.....	36
3.2.7. Reativação dos fermentos liofilizados comerciais.....	37
3.2.8. Influência da adição de mistura de bacteriófagos na produção de ácido láctico pelos fermentos comerciais.....	37
3.2.9. Atividade fágica dos fermentos submetidos à sub-cultivo diário.....	38
3.2.10. Isolamento de bactérias lácticas a partir dos fermentos comerciais.....	38
3.2.11. Sensibilidade das bactérias lácticas isoladas dos fermentos comerciais aos bacteriófagos.....	39
3.2.12. Observação dos bacteriófagos isolados por microscopia eletrônica.....	39
4. Resultados e Discussão.....	40
4.1. Análise das amostras coletadas nas indústrias.....	40
4.2. Isolamento dos bacteriófagos.....	45
4.3. Influência da adição de mistura de bacteriófagos na produção de ácido láctico pelos fermentos comerciais.....	48
4.4. Atividade fágica em fermentos sub-cultivados diariamente.....	51
4.5. Sensibilidade das bactérias lácticas isoladas dos fermentos comerciais aos bacteriófagos.....	54
Conclusões.....	59
Referências Bibliográficas.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1.Principais características das subespécies de <i>Lactococcus lactis</i>	6
Tabela 2.2.Classificação dos fermentos lácticos mesofílicos em função das características que conferem aos queijos...9	
Tabela 3.1.Tipo e composição dos fermentos comerciais utilizados nos testes de sensibilidade a fagos.....	31
Tabela 4.1.Acidez titulável (°D) de leite fermentado por <i>Lactococcus cremoris</i> na presença de amostra coletada em indústrias de leite.....	41
Tabela 4.2.Acidez titulável (°D) de leite fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> na presença de amostra coletada em indústrias de leite.....	42
Tabela 4.3.Acidez titulável (°D) de leite fermentado por <i>Lactococcus diacetylactis</i> na presença de amostra coletada em indústrias de leite.....	43
Tabela 4.4.Relação do tipo de amostras avaliadas nos diferentes lacticínios e atividade fágica observada nas diferentes amostras.....	46
Tabela 4.5.Acidez titulável (°D) do leite fermentado por diferentes fermentos comerciais na presença de mistura de bacteriófagos.....	49

Tabela 4.6. Diferença percentual, entre a acidez titulável (°D) do leite fermentado por diferentes fermentos comerciais na presença e ausência de bacteriófagos, em função do tempo de incubação.....	50
---	----

Tabela 4.7. Diferença percentual entre acidez titulável (°D) do leite fermentado na presença e ausência de bacteriófagos por fermentos sub-cultivados diariamente.....	52
--	----

Tabela 4.8. Sensibilidade fágica das bactérias isoladas dos fermentos.....	56
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação esquemática de três tipos morfológicos de bacteriófagos comumente encontrados.....	17
--	----

Figura 4.1. Fotomicrografia de bacteriófago de <i>L. lactis</i>	48
---	----

RESUMO

Levando-se em consideração os poucos conhecimentos sobre a incidência de bacteriófagos de bactérias lácticas mesofílicas, na indústria de leite do Estado de São Paulo, e, a sua influência sobre a capacidade acidificante dos fermentos lácticos disponíveis em nosso mercado, o presente trabalho foi conduzido com o intuito de esclarecer a real situação dos laticínios no Estado. Foram coletadas 33 amostras de soro de queijo em 17 laticínios, que foram submetidas ao teste de inibição da produção de ácido láctico, como medida prévia para avaliar a presença de bacteriófagos. Os soros resultantes desses experimentos quando submetidos ao teste de placa de lise, indicaram, que uma diminuição de 10% na acidez na presença de amostra suspeita, ao contrário do estabelecido na literatura, não reflete a veracidade da presença de bacteriófagos em uma amostra. Nossos resultados mostraram que 74% das amostras foram falso positivas e 1% delas, falso negativa. Dentre os 16 bacteriófagos isolados, 12 foram específicos para *L. lactis*, 3 para *L. diacetylactis* e 1 capaz de lisar ambos microrganismos, evidenciando atividade fágica em 66% das indústrias avaliadas. Utilizando uma mistura dos bacteriófagos isolados, procedeu-se aos testes com os fermentos lácticos comerciais (4 do tipo BD, 2 do tipo D, 5 do tipo O e 1 simples - *Lactococcus diacetylactis*). Em testes de acidificação dos fermentos, em 8 horas, somente 2 do tipo O mostraram diferença na capacidade de acidificação. Verificou-se que os fermentos submetidos à repicagem diária, mantiveram os bacteriófagos após 20 subcultivos em 2 fermentos (tipos BD e D), com variação na capacidade acidificante somente para o tipo BD. A partir dos fermentos, foram obtidas bactérias componentes, que foram testadas individualmente quanto à resistência aos bacteriófagos, mostrando que o nível de sensibilidade varia consideravelmente: 23% do fermento BD₁ e 40% do fermento D₂. O fermento O₃, composto de 5 cepas, 1 mostrou sensibilidade e o fermento O₄, constituído de 4 cepas, 2 foram sensíveis. 5 bacteriófagos de nossa coleção não se mostraram infectivos a nenhum dos isolados. Um dos bacteriófagos mostrou-se infectivo para a quase totalidade dos isolados.

SUMMARY

Since the knowledge of phage on mesophilic acid bacteria in milk processing industry of the State of São Paulo, and its effect on acidification performance of commercially available lactic acid starter, this work was designed to elucidate the real situation of milk industry in this State. A total of 33 samples of whey were collected in 17 cheese factories and tested on hability to inhibity acid production by selected starter as a mean to detect the presence of bacteriophage. These tests have shown that a decrease of 10% or more in the amount of acid produced in the presence of suspected sample, was not good indicative of presence of phage as it has been assumed in the literature. Our results showed that 74% of samples were false positive and 1 % were false negative. Amongst 16 phages isolated 12 were specific for *L.lactis*, 3 for *L.diacetylactis* and one was capable to cause lyses of both species, which indicates contamination in 65% of the industries analyzed. Commercially available starters (4 type BD; 2 type D; 5 type O and one simple starter) were tested with mixture of isolated phages. With acidification test for 8 hours, only 2 type O showed positive results. Daily transfer of cultured retained phages even after 20 subcultures in both types (BD and D), with acidification difference only on type BD. Pure cultures isolated from commercial starters were tested for phage resistance. Among isolated from BD₁, 23% were sensitive; from D₂, 40% were sensitive. The starter O₃ were composed of 5 strains, and one were sensitive; starter O₄ with 4 strains, 2 were sensitive. Five of isolated phages were not infective on any of the isolates but one of them were infective for most of them.

1. INTRODUÇÃO

Através de processos microbiológicos, é possível transformar o leite em outros produtos mais estáveis, os quais, além de manter os elementos essenciais para uma boa dieta, são de fácil transporte e conservação. O processamento de queijos e de outros produtos lácticos nasceu dessa necessidade de transformação do leite cru, em produtos mais estáveis, utilizando-se para tal fim, a acidificação biológica natural e a empírica. Em consequência do melhoramento das qualidades higiênicas do leite, representada pela pasteurização, tornou-se necessário substituir a microbiota selvagem do leite, destruída pelo tratamento térmico. A microbiota adicionada é conhecida como cultura iniciadora ("starter") ou fermento láctico, sendo composta de uma ou mais linhagens de bactérias, pertencentes ou não, ao mesmo gênero ou espécie (SANTOS et alii, 1986).

Existem muitos fatores que afetam o crescimento e a atividade das culturas iniciadoras, podendo levar a uma diminuição na capacidade da cultura em produzir a acidez desejada no tempo previsto. A infecção da cultura iniciadora por bacteriófagos é um deles.

Os bacteriófagos são vírus, que quando atacam as bactérias, podem causar dois tipos de consequências: lise celular, causada pelos fagos virulentos, ou a sua permanência dentro da célula hospedeira integrado ao seu DNA, chamados fagos temperados ou prófagos; tal estado, é chamado de lisogenia.

Muitas linhagens de lactococos presentes nos fermentos são lisogênicas, sugerindo que os fagos temperados liberados, sejam a principal fonte de bacteriófagos líticos na indústria de fermentação do leite. Segundo JARVIS (1984), entretanto, é improvável que essa seja a maior fonte de contaminação em plantas de processamento. O leite é, provavelmente, uma outra fonte de fagos, uma vez que estes podem

se multiplicar em linhagens de bactérias, naturalmente presentes no leite cru (HEAP et al. 1978).

Segundo KLAENHAMMER (1984) os bacteriófagos são comuns em plantas de processamento de queijo em todas as partes do mundo, mesmo quando são adotadas medidas higiênicas rigorosas, rotação de culturas e linhagens fago resistentes.

Considerando-se que a ação dos bacteriófagos sob as culturas iniciadoras pode levar à lise celular, acarretando uma diminuição na atividade acidificante pela cultura, com consequente prejuízo na qualidade final do queijo ou no processamento em geral, torna-se extremamente importante avaliar a presença de bacteriófagos na indústria.

O presente trabalho teve por objetivos, o isolamento de bacteriófagos a partir de amostras de soro de queijo, de diversas indústrias de leite do Estado de São Paulo. A partir dos bacteriófagos isolados avaliar o comportamento acidificante de fermentos lácticos comerciais: influência da mistura de bacteriófagos na produção de ácido láctico, atividade fágica em fermentos submetidos à repicagem diária e sensibilidade das bactérias isoladas dos fermentos aos bacteriófagos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do processo de fermentação do leite, com propriedades e características desejáveis, foi originalmente obtido, a partir da contaminação microbiana natural do leite e de seus resíduos. Somente em 1873, LISTER isolou o *Streptococcus lactis*, a bactéria lática mais comum e numerosa nos leites fermentados (LUNDSTEDT, 1983). A prática de inocular leite com culturas puras foi desenvolvida no início do século 20, sendo antes disso utilizada a prática de inocular o leite novo com o soro da fermentação anterior (THUNEL & SANDINE, 1985).

As bactérias do ácido láctico são importantes comercialmente, devido à capacidade de fermentar carboidratos e produzir ácido láctico, o qual coagula a caseína do leite em pH 4,6, seu ponto isoelétrico (KOSIKOWSKI, 1978). Na indústria de produção de queijos, tais organismos fermentadores, adicionados ao leite para obtenção de subprodutos, são conhecidos como culturas iniciadoras ou fermentos. Os produtos, resultantes de seu metabolismo, exercem efeito sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo, sendo particularmente importante a produção do ácido láctico, que contribui para a coagulação e textura do produto final (BRITO, 1990); sobre a produção de ácidos voláteis, que contribui para o sabor e aroma; sobre a produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas, importantes na maturação de alguns tipos de queijos (FREDERICK *et al.* 1986; KAMAL & MARTH, 1988), e sobre a inibição do crescimento de patógenos e deterioradores, eventualmente presentes na matéria prima (CHAVARI *et al.* 1991; NUNEZ *et al.* 1986).

A redução da atividade fermentativa das culturas lácticas iniciadoras gera consequências de importância tecnológica: diminuição da liberação do soro (sinérese); prejuízo

no desenvolvimento de sabor, aroma e textura do produto final (FURTADO, 1991); riscos para a saúde pública, devido à possibilidade de desenvolvimento de bactérias patogênicas heterofermentativas (GUDKOV et al., 1976).

2.2. BACTÉRIAS LÁCTICAS

Morfologicamente, as bactérias do ácido láctico apresentam-se como cocos ou bastonetes, Gram-positivos, imóveis, microaerófilos, não esporulados, catalase negativos e não redutores de nitrito. A principal característica de alguns membros desse grupo é a utilização da lactose como fonte de carbono e, a partir da fermentação, a produção quase que exclusiva de ácido láctico (bactérias lácticas homofermentativas) ou, além deste, outras substâncias como o etanol, o ácido acético, o glicerol e o dióxido de carbono, no caso das bactérias lácticas heterofermentativas (KOSIKOWSKI, 1978).

As bactérias lácticas compreendem um grande número de espécies, agrupadas em quatro gêneros: *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (STANTER et al., 1986). Dentro do gênero *Streptococcus* encontram-se as bactérias lácticas mais importantes na fermentação mesofílica do leite, usualmente conhecidas como *S. lactis*, *S. cremoris* e *S. diacetylactis*. Essas espécies são cocos homofermentativos, cuja temperatura ótima de crescimento encontra-se por volta dos 30°C. São utilizadas comumente na produção de queijos tanto de massa crua como de massa semicozida (SANDJNE, 1985).

As principais diferenças, entre as cepas de *S. lactis* e *S. cremoris*, são a incapacidade do segundo, de crescer em presença de 4% NaCl, não produzir amônio a partir da arginina e não fermentar a maltose (CAVETT, 1967). SWARTLING (1951)

descreveu as cepas de *S. lactis* subespécie *diacetylactis* como organismos similares ao *S. lactis* sub. *lactis* na maioria das suas características, diferenciando-se somente na capacidade de metabolizar o citrato e produzir acetoina, CO_2 e diacetil. SANDINE et al. (1982), entretanto, sugeriram que o *S. lactis*, subespécie *diacetylactis*, fosse classificado como uma espécie diferenciada do *Streptococcus lactis*.

GARVIE & FARROW (1982), ao contrário, consideraram que, dentro de grupos com alta homologia de DNA, linhagens que se diferenciavam apenas por poucas propriedades fisiológicas, deveriam ser consideradas como subespécies, mantendo, portanto, uma única espécie com três subespécies: *S. lactis* subespécie *lactis*, *S. lactis* sub. *cremoris* e *S. lactis* sub. *diacetylactis*. Na nona edição do "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", (SNEATH et al. 1986), essa classificação proposta por GARVIE & FARROW (1982) foi mantida, baseada em algumas características adicionais: idênticas quinonas isoprenóides e idênticas β -fosfogalactase; apresentarem desidrogenases lácticas indistinguíveis e possuírem idêntica porcentagem de guanina-citosina no DNA cromossomal. Segundo MUNDT (1986), as poucas propriedades que distinguem essas três subespécies são controladas por plasmídeos, havendo alta homologia de DNA.

Recentemente, SANDINE (1988), propôs uma nova taxonomia para o gênero *Streptococcus*, que foi confirmada pela "International Union of Microbiological Societies" (1986), com as seguintes denominações para as três subespécies de *Streptococcus lactis*: *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, *L. lactis* subespécie *cremoris* e *L. lactis* subespécie *lactis* var. *diacetylactis*. O novo gênero *Lactococcus* foi criado para todos os estreptococos do grupo sorológico N de Lancefield.

Essa nova nomenclatura será adotada no decorrer deste trabalho como *L. lactis*, *L. cremoris* e *L. diacetylactis*, encontrando-se as principais diferenças entre as subespécies listadas na TABELA 2.1.

Os lactococos podem apresentar diferentes comportamentos em leite. São consideradas culturas lentas, aquelas que falham em coagular o leite a 21-22°C em 18 horas, e culturas rápidas, as que coagulam o leite nessas condições (COGAN, 1982). Segundo McKAY (1983), as linhagens lentas são cepas que não têm ou que perderam o sistema proteínase, responsável pela coagulação do leite, e são denominadas Prt-, enquanto as rápidas são denominadas Prt+.

TABELA 2.1. Principais características de crescimento das subespécies do *Lactococcus lactis* (SANDINE et al., 1980).

CRESCIMENTO	<i>L. lactis</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>L. diacetylactis</i>
10°C	+	+	+
40°C	+	-	+
45°C	-	-	-
pH 9.2	+	-	+
4,0% NaCl	+	-	+
NH ₃ (a partir da arginina)	+	-	+
CO ₂ (a partir do citrato)	-	-	+
Grupo Sorológico	N	N	N

No leite cru, o *L. cremoris*, geralmente, é encontrado em números inferiores aos de *L. lactis*, porém, nos fermentos lácticos, essa relação se inverte. Esse fato pode ser uma decorrência da maior sensibilidade do *L. lactis* ao ataque de bacteriófagos (LAWRENCE et al., 1976). Considerando que o *L.*

cremoris, ao contrário do *L. lactis*, não produz características como sabor amargo ou de frutas, em queijos, a indústria tem demonstrado grande interesse na utilização desse microrganismo (RICHARDSON *et al.*, 1983).

Dentro do gênero *Leuconostoc* algumas espécies também são utilizadas como iniciadoras mesofílicas, em combinação com os lactococos. O gênero foi dividido por GARVIE (1980) em quatro espécies: *Leuconostoc oeno*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc paramesenteroides* e *Leuconostoc mesenteroides*. A espécie *mesenteroides* foi ainda subdividida em 3 subespécies: subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum* e subsp. *cremoris*. A diferença básica, entre os gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc*, é a capacidade dos leuconostocs de produzir gás a partir da fermentação da glicose, além da produção de D(-)lactato.

Os representantes do gênero *Leuconostoc* são heterofermentativos, capazes de produzir ácido láctico, CO₂ e compostos aromáticos também a partir da lactose. A importância tecnológica da utilização de *Leuconostoc*, particularmente *Leuconostoc cremoris*, na produção de queijos, reside na sua capacidade de fermentar citrato, conferindo aromas característicos aos queijos (SHARPE, 1979).

Tanto o *Leuconostoc* quanto o *Lactococcus diacetylactis* dispõem de uma permease específica, que transporta citrato através da membrana celular, com atividade ótima em pH 5,0 e cuja expressão, em algumas linhagens, é determinada por genes alojados em plasmídeos que podem ser facilmente perdidos (KEMPLER & McKAY, 1979). Uma vez que os *Leuconostocs* possuem fraca habilidade fermentativa (produção de ácido láctico), sua utilização deve ser feita sempre em associação com lactococos produtores de ácido, a fim de se obter uma fermentação vigorosa do citrato (SANDINE, 1985).

2.3. FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIAIS

Segundo LAWRENCE et al. (1976), os fermentos lácticos mesofílicos usados comercialmente, podem ser classificados em 3 tipos básicos: 1) linhagens únicas, que contêm cepas puras de *Lactococcus lactis* ou *L. cremoris*; 2) linhagens múltiplas, que contêm misturas definidas de 3 ou mais cepas puras de *L. lactis* e *L. cremoris* e 3) linhagens mistas, que contêm misturas de *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis* e *Leuconostoc*, com composição e proporções desconhecidas. Os fermentos de linhagens mistas podem ter suas proporções alteradas sob condições de subcultivo (REDDY et al., 1972).

L. lactis e *L. cremoris* produzem, principalmente, ácido láctico a partir da lactose, e, são chamados, frequentemente de fermentos produtores de ácido. *L. diacetylactis* e *Leuconostoc*, ao contrário, produzem importantes metabólitos a partir do citrato, como o CO₂, o acetaldeído e o diacetil, e são chamados de fermentos produtores de sabor e aroma (KOSIKOWSKI, 1978).

As culturas lácticas mesofílicas mistas são utilizadas largamente na fabricação de queijos frescos, de massa crua e semicorizada, e dependendo da natureza da produção de sabor e aroma, são usualmente classificados em função das principais características que conferem aos produtos finais (TABELA 2.2).

A utilização de culturas iniciadoras mesofílicas de composição desconhecida é uma prática comum em muitos países, especialmente na Europa e América do Norte (PETTERSSON, 1988). Segundo STADHOUDERS (1975), a principal razão para essa prática é a menor sensibilidade dessas culturas em relação aos bacteriófagos.

TABELA 2.2. Classificação dos fermentos lácticos mesofílicos em função das características que conferem aos queijos (COGAN & DALY, 1987).

TIPO	MICROORGANISMOS	CARACTERÍSTICAS
B ou L	<i>L. lactis</i> e/ou <i>L. cremoris</i> <i>Leuconostoc</i>	ácido, aroma e gás
D	<i>L. lactis</i> e/ou <i>L. cremoris</i> <i>L. diacetylactis</i>	ácido, aroma e muito gás
BD ou DL	<i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> <i>L. diacetylactis</i> e <i>Leuconostoc</i>	ácido, aroma e olha-duras
O	<i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i>	ácido

Diversos estudos têm mostrado que, sobre condições de contaminações da cultura por bacteriófagos, ocorrem diversas mudanças na composição do fermento, com predomínio das linhagens resistentes aos bacteriófagos (STADHOUDERS & LEENDERS, 1984). Essa resistência foi caracterizada mais como uma propriedade das linhagens dominantes, do que como um balanço das características da mistura como um todo (SPILLMAN & BANHEGYI, 1986).

Estudos comparativos entre as características de queijos processados com fermentos de linhagens únicas e fermentos de linhagens mistas, demonstraram uma melhor qualidade do produto final quando são utilizadas linhagens mistas (AMER et al. 1983).

As culturas iniciadoras com linhagens definidas foram originalmente desenvolvidas na Nova Zelândia (LAWRENCE & PEARCE, 1972), e têm-se evidenciado a possibilidade de composição de fermentos resistentes aos bacteriófagos, utilizando-se poucas cepas (LIMSOWTIN et al., 1977). As linhagens podem ser utilizadas isoladas, aos pares ou múltiplas (DALY, 1983). Segundo REDDY et al. (1972), esse tipo de cultura possui a vantagem de uma maior

padronização e estabilidade nas características, em fermentações seguidas.

Alterações na composição de fermentos com linhagens mistas, podem ser ainda derivadas de interações entre os próprios componentes do fermento, presença de antibióticos e ataque de bacteriófagos (HUGENHOLTZ, 1986).

2.4. BACTERIÓFAGOS

Dentre os muitos fatores que afetam o crescimento e a atividade das culturas iniciadoras, o mais comum é a infecção da cultura por bacteriófagos, que causam uma redução na capacidade de produzir a acidez desejada, no tempo previsto (BABEL, 1946).

Bacteriófagos ou fagos são vírus específicos que possuem a capacidade de infectar e lisar bactérias. As primeiras descrições de fagos foram feitas em 1915 (TWORT, 1915) e a lise de bactérias do ácido láctico causada por fagos, foi primeiramente descrita em 1935 (WHITEHEAD & COX, 1935).

Se uma cultura industrial é infectada por bacteriófagos, pode ocorrer a lise celular, cessando rapidamente a produção de ácido láctico e, conseqüentemente, resultando queijos com alto pH e alto conteúdo de lactose. Nesses produtos, pode ocorrer o desenvolvimento de bactérias patogênicas e heterofermentativas não iniciadoras, causando problemas de saúde pública. A insuficiente produção de ácido láctico resulta também diminuição da expulsão do soro e prejuízo no desenvolvimento do sabor, aroma e textura do produto final (FURTADO, 1991).

Em 1942, ANDERSON & MEANWELL apresentaram um procedimento que demonstrava a inibição da produção de ácido láctico pela presença de bacteriófagos, baseada na diminuição de

10% ou mais na quantidade de ácido láctico produzida pela cultura, crescida em leite, na presença de amostra suspeita.

2.4.1 REPRODUÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS

Os bacteriófagos infectam as células bacterianas com a sua informação genética, modificando o metabolismo bacteriano, de tal maneira, que a multiplicação fágica ocorre às custas do hospedeiro (ADAMS, 1959). O processo infectivo dos bacteriófagos pode ser dividido em 4 estágios: adsorção da partícula fágica na célula hospedeira; penetração do DNA fágico na bactéria; multiplicação intracelular dos bacteriófagos; lise da célula hospedeira com liberação da progênie fágica. Esse processo é conhecido como ciclo lítico (ADAMS, 1959).

A propagação de bacteriófagos líticos em bactérias é iniciada com sua adsorção na superfície celular desta. BUDDE-NIEKIEL & TEUBER (1987) estudaram o mecanismo de adsorção de fagos virulentos em linhagens de bactérias sensíveis e resistentes, através de microscopia e revelaram dois tipos de adsorção: adsorção em distintos pontos da superfície celular e adsorção uniforme por toda superfície. A adsorção é um evento altamente específico, o qual depende da presença de receptores fágicos apropriados, na bactéria hospedeira. Uma simples modificação pode causar perda da habilidade de adsorver um bacteriófago específico, sem, no entanto, perder a susceptibilidade a outro bacteriófago (ADAMS, 1959). ORAM (1971) estudou o fago ML3, específico para *L. lactis* ML 3, e observou que o receptor fágico é parte da membrana citoplasmática, provavelmente um complexo lipoproteico. VALYASIKI *et al.* (1989), por sua vez, sugeriram que a ligação bactéria-bacteriófago ocorre em nível de parede celular, pois há uma significativa redução nas

ligações fágicas, quando fragmentos celulares são tratados com metanolisina. Verificou-se também que a adsorção de alguns bacteriófagos de lactococos pode ser reduzida na presença de renina (KEOGH, 1973).

A presença de cátions divalentes (Ca^{++} em particular) é considerada essencial para a adsorção do bacteriófago e sua multiplicação (COLLINS *et al.*, 1950). POTTER (1970) sugeriu que o requerimento de cálcio, depende do hospedeiro e não do bacteriófago, uma vez que de 8 bacteriófagos estudados, 3 deles apresentaram variáveis requerimentos de cálcio quando propagados em diferentes hospedeiros. Tal requerimento de cálcio mostrou-se maior para bacteriófagos crescidos em *L. cremoris* do que em *L. lactis*. IESFAIGZI & SUSSMUTH (1989) estudaram o comportamento de 3 linhagens de *L. lactis* e bacteriófagos na ausência e presença de CaCl_2 , demonstrando que as bactérias são mais sensíveis aos bacteriófagos, na presença de cálcio. Alguns bacteriófagos, entretanto, não requerem cálcio para a adsorção nas bactérias hospedeiras (KRIEL *et al.*, 1978).

Algumas bactérias possuem enzimas de restrição, que reconhecem o DNA fágico, após sua injeção na célula e o degradam imediatamente. Alguns bacteriófagos, entretanto, conseguem escapar desse mecanismo de defesa, porque apresentam DNA modificado por uma enzima de modificação, não sendo degradado pela enzima de restrição. Tal sistema é chamado sistema restrição/modificação (R/M) e responde pela pequena propagação de alguns bacteriófagos, nas bactérias hospedeiras (PEARCE, 1978). BOUSSEMAER *et al.* (1980) sugeriram que o sistema R/M é um dos principais mecanismos de defesa dos lactococos contra seus bacteriófagos e que os programas de combate a bacteriófagos, deveriam basear-se nesse mecanismo. Em seguida, enzimas de restrição foram isoladas e caracterizadas em *Lactococcus cremoris* (FITZGERALD *et al.*, 1982).

ELLIS (1939) mostrou que o desenvolvimento de bacteriófagos, sob condições de mínima infecção inicial, depende

de duas principais características individuais dos bacteriófagos: 1) do período de latência, ou tempo mínimo entre infecção da bactéria e lise celular e 2) da produção média de partículas fágicas por bactéria infectada, conhecida como "burst size".

Segundo ZEHREN & WHITEHEAD (1954), o período de latência e o "burst size" são características do bacteriófago, uma vez que, em seus estudos, duas raças de bacteriófagos foram capazes de atacar uma mesma bactéria com diferentes períodos de latência e "burst size". O autor observou que um aumento da temperatura de incubação, de 22°C para 37°C, levou a uma diminuição no período de latência, mas não mostrou efeito significativo no "burst size". Segundo KEOGH (1973), o "burst size" de bacteriófagos é influenciado pelo hospedeiro no qual ele é propagado, uma vez que, em linhagens de lactococos usados em manufatura de queijos, um aumento de temperatura de 30°C para 37°C diminui o período latente, mas pode aumentar, diminuir ou não ter efeito no "burst size". Tal aumento de temperatura, também, é capaz de diminuir a porcentagem de adsorção do bacteriófago no hospedeiro.

Uma outra forma de replicação de bacteriófagos em bactérias é a lisogenia, na qual, após a penetração do DNA fágico na célula hospedeira, a reprodução de novas partículas fágicas é reprimida, e o DNA do bacteriófago é integrado ao cromossomo bacteriano por recombinação. Nesse caso, a lise da bactéria não ocorre e o DNA fágico (na forma de prófago) é replicado em sincronia com o DNA bacteriano, dando como resultado uma progênie de células lisogênicas (d'Herele, 1930).

A existência de linhagens lisogênicas em lactococos foi demonstrada primeiramente por REITER (1949), ao observar que três linhagens liberavam bacteriófagos espontaneamente, causando lise em uma linhagem indicadora apropriada. Em 1978, REITER & KIRIKOVA isolaram linhagens lisogênicas em culturas iniciadoras comerciais, que liberavam bacteriófagos temperados, quando induzidos através de radiação ultra-violeta (U.V.). NEVE & TEUBER

(1991) estimam que 60-70% das linhagens de lactococos são lisogênicas. Tais linhagens podem ser induzidas a liberar bacteriófagos virulentos através de luz U.V. (McKAY & BALDWIN, 1973; GASSON & DAVIES, 1980) e mitomicina C (LOWRIE, 1974; REYROLLE *et al.*, 1982) sendo capazes de lisar outras bactérias, de maneira comparável à infecção regular causada por bacteriófagos líticos.

Estudo feito por KOZAK *et al.* (1973) mostrou que algumas linhagens de lactococos, liberam bacteriófagos espontaneamente e por indução por U.V., enquanto outras só liberam espontaneamente. Segundo FURTADO (1991), a liberação espontânea de prófagos parece ocorrer em apenas 25% dos casos, não sendo ainda bem conhecidas as causas desse fenômeno. MEISTER & REDFORD (1979) estudaram as condições culturais para indução de bacteriófagos temperados e notaram que a indução é mais efetiva, a temperaturas iguais ou inferiores a 30°C, não sendo afetada pela presença de cálcio ou fosfato.

Uma célula lisogênica torna-se protegida contra a infecção pelo mesmo tipo de bacteriófago. Essa imunidade, entretanto, pode ser perdida no caso de o prófago ser liberado de forma espontânea ou induzida (HUNGER, 1986). Segundo ANDERSON *et al.*, (1981), os bacteriófagos podem-se comportar como temperados, para determinados hospedeiros, e virulentos, para outros, sendo tal propriedade dependente da bactéria hospedeira.

Segundo LAWRENCE *et al.* (1976), o uso de culturas lisogênicas, como fermentos, pode contribuir para a disseminação de populações fágicas, e a prevenção da indução de bacteriófagos líticos, nos fermentos industriais, é essencial. HUGGINS & SANDINE (1977), estudando 63 linhagens isoladas de culturas comerciais, mostraram que 38 delas produziam bacteriófagos intactos, quando induzidos com mitomicina C ou U.V. Em recente trabalho, BLACK (1990) também demonstrou a presença de linhagens lisogênicas, em fermentos comerciais.

A pseudolisogenia é outro tipo de relação bactéria-bacteriófago, no qual um bacteriófago lítico mantém-se em equilíbrio estável em uma população bacteriana. Tal estado difere da lisogenia, porque tais bactérias são facilmente separadas de seus bacteriófagos, através de plaqueamentos ou reisolamento (GRAHAM *et al.*, 1952).

Outro fator que influi no desenvolvimento de bacteriófagos, em culturas bacterianas, é a temperatura de incubação. EDDY & HULL (1987) demonstraram que um bacteriófago específico se multiplicou, mais rapidamente, em uma linhagem susceptível, à temperatura de 38°C, usada no processamento de queijo, do que na temperatura de 30°C utilizada na repicagem da cultura. KRIEL & HOLZAPFEL (1977), em estudo sobre as melhores condições de propagação de culturas, verificou que, a 15°C, o número final de partículas fágicas/ml foi menor que a 22°C. Segundo SANDERS & KLAENHAMMER (1984), a 40°C, o desenvolvimento de bacteriófagos é caracterizado por um menor período latente e um maior número de bacteriófagos liberados, do que a 30°C. Esses dados sugerem a existência de mecanismos dependentes da temperatura nas bactérias resistentes aos bacteriófagos. Algumas vezes, entretanto, o aumento da temperatura pode inibir a multiplicação dos bacteriófagos (KEOGH, 1973).

Estudos feitos por MULLAN *et al.* (1981), demonstraram que os bacteriófagos por eles avaliados, replicavam extensivamente a 30°C, causando inibição da produção de ácido láctico, enquanto que alguns sofriam redução de replicação, a 38°C e ou 40°C, sem nenhuma redução aparente na produção de acidez, em comparação com o controle. Esses dados sugerem que as linhagens iniciadoras têm menor possibilidade de falhar, devido a ataque fágico, quando a temperatura de processamento é mantida a 38°C ou 40°C.

HULL & BROOKE, (1982) relataram que alguns bacteriófagos isolados de culturas iniciadoras, multiplicam-se

mais rapidamente em leite cru do que em leite tratado termicamente e foram, posteriormente, chamados de bacteriófagos de leite de cru. Esses bacteriófagos mostraram maior atividade somente nas temperaturas acima de 30°C, sugerindo os autores que não causariam distúrbios em culturas intermediárias, normalmente incubadas a temperaturas de 22-25°C. FORD & BABEL (1950), em estudo sobre a retenção de bacteriófagos por culturas bacterianas, mostraram que, em temperatura de 21°C, foram necessárias 137 transferências para que a cultura se mostrasse livre do bacteriófago, enquanto a 37°C, somente 10 transferências foram suficientes. KEOGH (1983), estudando a longevidade de diferentes bacteriófagos em temperatura de congelamento, notou comportamentos variáveis, porém, de maneira geral, sem perda significativa no seu poder infectante, após 20 anos nestas condições.

Em 1950, OVERCAST *et al.*, verificaram que alguns bacteriófagos apresentam redução na capacidade de multiplicação, em pH inferior a 5,4, enquanto outros não apresentaram tal redução, mesmo em pH 4,8.

2.4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos, que invadem as bactérias lácticas mesofílicas, têm sido amplamente estudados, quanto a sua caracterização e efeito sobre culturas iniciadoras, isso em função dos problemas que provocam quando da utilização dos fermentos lácticos.

Os bacteriófagos apresentam um amplo espectro de tipos morfológicos. No caso das bactérias lácticas, com poucas exceções, os bacteriófagos se enquadram morfolologicamente nos grupos A ou B da classificação de BRADLEY (1967), e quase todos os bacteriófagos de *L. lactis* e *L. cremoris* têm sido enquadrados no

grupo B. Tipicamente, os bacteriófagos de lactococos mesófilos podem ser diferenciados, pelo tamanho e formato da cabeça em: isométrico pequeno (30-61 nm), isométrico grande (67-85 nm) e prolata (60-45 nm) (FIGURA 2.1).

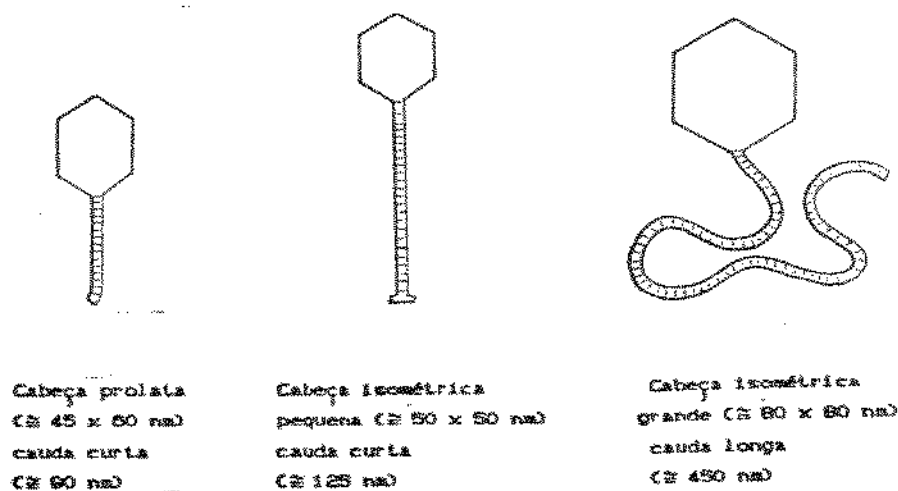


FIGURA 2.1. Representação esquemática de três tipos morfológicos de bacteriófagos comumente encontrados (extraído de LAWRENCE, 1978).

Fagos prolatos possuem caudas curtas (usualmente menores que 100 nm) e os bacteriófagos isométricos grandes possuem longas caudas (450 nm) (KEOGH & SHIMMIN, 1974). Esses autores também notaram que muitos dos bacteriófagos isométricos e poucos dos prolatos possuem colares e bases, que são estruturas complexas.

Segundo LAWRENCE (1978), o tipo mais comum em bactérias lácticas é o isométrico pequeno com cauda curta. Um estudo feito por SAXELIN *et al.* (1986) também demonstrou diferenças morfológicas, em relação ao tamanho da cauda, presença ou ausência de colar, placa de base e fibras da cauda, além das características da cabeça do bacteriófago.

Um estudo da morfologia de bacteriófagos isolados em indústria de leite e sua especificidade em relação a linhagens de *Lactococcus lactis*, *L. diacetylactis*, *L. cremoris* e *Leuconostoc cremoris*, isolados de fermentos, foi feito por SAXELIN et al. (1986). MOYNET et al. (1989) caracterizaram 8 bacteriófagos de diferentes grupos, quanto à morfologia e tamanho.

TERZAGHI (1976) encontrou similaridades morfológicas entre alguns bacteriófagos líticos e temperados, sugerindo que a maioria dos bacteriófagos líticos originaram-se dos bacteriófagos temperados. Em estudo da especificidade ao hospedeiro, esse autor notou que os bacteriófagos prolatos mostraram-se menos específicos, com um amplo espectro de hospedeiros, ao contrário dos isométricos grandes com caudas, que se mostraram mais específicos, com poucos hospedeiros atingidos. Alguns bacteriófagos só se diferenciaram entre si quanto ao hospedeiro.

LEMBKE & TEUBER (1981), através de estudos sorológicos de bacteriófagos coletados em indústrias, revelaram que o número de bacteriófagos e de culturas de lactococos, realmente diferentes, é baixo, e que os tipos, morfológicamente distintos de bacteriófagos, são pouco numerosos, parecendo haver uma correlação entre morfologia do bacteriófago e o tipo de hospedeiro. Os grupos morfológicos de bacteriófagos têm sido correlacionados através de estudos moleculares e de homologia DNA-DNA (JARVIS & MEYER, 1986; HILL et al., 1991). JARVIS (1984) comparou grupos de bacteriófagos lácticos quanto à morfologia, sorologia e homologia de DNA, sugerindo que tais grupos constituem diferentes espécies de bacteriófagos. Em 1977, JARVIS subdividiu bacteriófagos de lactococos em 6 tipos morfológicos, mostrando que bacteriófagos relacionados quanto a morfologia e sorologia, provavelmente, infectam hospedeiros comuns. Recente estudo comparou bacteriófagos de lactococos isolados, nos E.U.A. e na Argentina, em relação a vários aspectos, e os resultados sugerem homologia entre os bacteriófagos isolados nos dois países

(FABRIZIO *et al.*, 1991). HEAP & JARVIS (1980) mostraram que bacteriófagos isométricos e prolatos são sorologicamente diferentes.

RELANO *et al.* (1987) estudaram 33 bacteriófagos virulentos e 5 temperados de *Lactococcus lactis* e *L. cremoris*, diferenciando-os em 3 grupos, através de homologia de DNA, sugerindo que os bacteriófagos líticos e temperados, obtidos por indução podem estar correlacionados.

COVENEY *et al.* (1987) estudaram bacteriófagos de *L. cremoris* e *L. diacetylactis* quanto aos aspectos morfológicos e moleculares, notando que os bacteriófagos de mesmo grupo morfológico, são bem relacionados molecularmente. Análises do perfil de proteínas entre os bacteriófagos, entretanto, mostraram maiores diferenças entre os de mesmo tipo morfológico.

2.4.3. ESPECIFICIDADE

Encontra-se bem estabelecido, o fato de que os bacteriófagos são frequentemente seletivos quanto à invasão de certas linhagens de bactérias, dentro de uma mesma espécie (BURNET, 1934).

Tal fenômeno tem sido utilizado, na classificação e subdivisão de linhagens similares de bactérias relacionadas por sua sensibilidade fágica. Através de testes, envolvendo bacteriófagos particulares contra diferentes linhagens de bactérias, o padrão lítico pode ser determinado e, dessa forma, pode-se agrupar os bacteriófagos de acordo com os hospedeiros (NICHOLS & HOYLE, 1949).

Confirmando a tendência da espécie-especificidade dos bacteriófagos, HENNING *et al.* (1968) dividiram os

bacteriófagos em 8 grupos de acordo com as bactérias hospedeiras: grupo A, os que atacam principalmente *S. diacetylactis*; e grupos B a H, os que atacam *L. cremoris* e *L. lactis* CHOPIN *et al.* (1976) definiram 8 grupos de bacteriófagos, a partir de 132 isolados da indústria, baseados na atividade lítica. Segundo LAWRENCE *et al.* (1976), os bacteriófagos de *L. cremoris* são mais espécie-específicos que os de *L. lactis*. Normalmente, os hospedeiros de bacteriófagos de lactococos são restritos a uma subespécie (*lactis* ou *cremoris*), mas a infecção de ambas as subespécies, por um determinado bacteriófago, foi descrita por CHOPIN *et al.* (1976). Tais padrões podem ser alterados rapidamente, devido a modificações sofridas pelos bacteriófagos ou pelas linhagens de bactéria (BOUSSEMAER, 1980). RELANO *et al.* (1987) sugeriram, a partir de seus estudos, que a característica de especificidade apresenta pequeno valor taxonômico, uma vez que bacteriófagos com 100% de homologia de DNA, podem mostrar um espectro lítico completamente diferente, enquanto os de mesmo padrão lítico podem apresentar menor grau de homologia de DNA.

HEAP & JARVIS (1980) demonstraram que bacteriófagos prolatos possuem maior número de hospedeiros que os isométricos; que os isométricos são detectados com maior frequência em lisados de bactérias induzidas por radiação U.V.; e que a taxa de replicação dos isométricos é pouco superior à dos prolatos. Esses autores propuseram que as diferenças observadas, no espectro de hospedeiros, podem ser explicadas pelo fato de que a maioria dos bacteriófagos temperados são isométricos e que a lisogenia confere imunidade a bacteriófagos similares.

SINHA (1980) verificou que o mutante ML 1 de *L. lactis* mostrou simultânea aquisição de sensibilidade e resistência a diferentes bacteriófagos.

Bacteriófagos temperados, de um amplo espectro de lactococos, foram examinados por REYROLLE *et al.* (1982), e seus espectros líticos foram estabelecidos, apresentando boa correlação com os bacteriófagos virulentos que atacam a mesma espécie.

2.5. CONTROLE E PREVENÇÃO DE BACTERÍÓFAGOS EM CULTURAS INICIADORAS

A prevenção da contaminação por bacteriófagos, durante a preparação dos fermentos utilizados na indústria, é essencial (SANDINE, 1977). Uma vez que a contaminação das culturas iniciadoras por bacteriófagos não pode ser evitada após a entrada da cultura, no tanque de fermentação, o processamento de queijos, pode ser, então, prejudicado pela destruição causada pelos bacteriófagos (HUNGER, 1986).

Os bacteriófagos encontram-se disseminados no solo, ar, água e outros ambientes, sendo transportados com o leite para os laticínios, tornando o soro um agente carreador de bacteriófagos em potencial (HUNGER, 1986).

Alguns trabalhos foram feitos com relação à destruição de bacteriófagos e mostraram que 70 minutos, a 72,8°C, são necessários para sua completa destruição em leite, a pH 6,2. A destruição térmica é uma característica que varia entre os bacteriófagos (ZOTTOLA & MARTH, 1966 b).

CHOPIN (1980), estudando a eficiência da pasteurização, em relação aos bacteriófagos, não conseguiu estabelecer uma relação entre o padrão lítico do bacteriófago e sua resistência ao calor. Segundo DAoust (1965), a termoestabilidade fágica aumenta significativamente com o aumento dos níveis de fosfato e soro presentes no meio em teste, sendo por esse motivo, essencial um adequado manejo do soro dentro da fábrica.

EVERSON (1991) relaciona uma série de práticas sugeridas por RASMUSSEN, em 1980, que devem ser evitadas na planta de processamento de queijo, para evitar que o número de bacteriófagos aumentem.

WHITEHEAD & HUNTER (1947) introduziram as seguintes práticas para proteger as culturas contra um ataque fágico:

propagação de culturas em condições assépticas, uso de linhagens únicas não relacionadas a bacteriófagos em rotação de culturas e sanitização de utensílios e linha de processamento.

2.5.1 MEIOS INIBIDORES DE BACTERIÓFAGOS

A utilização de meios inibidores para obter uma proteção adicional, contra o ataque de bacteriófagos, tem sido introduzida. O desenvolvimento desses meios têm-se baseado na exigência de íons divalentes (principalmente cálcio) pela maioria dos bacteriófagos, para que ocorra a adsorção e penetração do DNA fágico na célula hospedeira.

Diversos meios inibidores foram desenvolvidos até o momento, variando quanto à composição e efetividade: leite de soja, acrescentado de 3% de lactose (FARAHAT *et al.*, 1984); soro e açúcar em sistema de pH controlado (REDDY & RICHARDSON, 1977); soro, monofosfato de amônio, difosfato de sódio e extrato de levedura (RICHARDSON *et al.*, 1977); leite, tampão K_2HPO_4 e KH_2PO_4 (3:2) como agente quelante e extrato de levedura (KRIEL *et al.*, 1976); leite, ortofosfato mono e dibásico, extrato de levedura e soro eletrodializado (ZOTTOLA & MARTH, 1966 b); leite, 1,7% ortofosfato e 0,3% pirofosfato (HARGROVE *et al.*, 1961). KRIEL & MOUNTFORD (1975) fizeram um estudo comparativo da eficiência de dois meios inibidores de bacteriófagos, em relação ao leite desnatado reconstituído, mostrando que tanto a eficiência de crescimento da cultura quanto a inibição de bacteriófagos, foi maior nos meios inibidores.

Uma vez que se tem isolado bacteriófagos lisando culturas, mesmo na ausência de cálcio disponível, foi sugerido que

o constante uso de meios inibidores pode levar à seleção de tais bacteriófagos (SOZZI, 1972).

2.5.2. SISTEMA DE ROTAÇÃO DE CULTURAS

O objetivo da rotação de culturas, como descrito por WHITEHEAD (1953), é reduzir o nível de bacteriófagos líticos na planta de processamento de queijos.

Baseada na espécie-especificidade dos bacteriófagos, tem-se empregado a combinação e a rotação de diversas linhagens iniciadoras, de forma a minimizar o nível de contaminação por um bacteriófago em particular. WHITEHEAD (1953) propôs a utilização de linhagens aos pares, pois se uma delas fosse atacada a outra continuaria a produção de ácido normalmente. Após o prazo de quatro dias, supondo que a concentração de um bacteriófago específico, para aquele determinado par estivesse elevada, a utilização de um novo par reduziria a contaminação a níveis mínimos.

A substituição de linhagens sensíveis, após o aparecimento de bacteriófagos, por outra linhagem não relacionada no sistema de rotação, evitaria queda na produção de ácido láctico, no caso da não suficiente redução de bacteriófagos residuais, no período da rotação da cultura (COLLINS, 1962). O problema observado é que, são poucas, as linhagens de lactococos não relacionadas quanto à sensibilidade aos bacteriófagos disponíveis para rotação de culturas (LAWRENCE, 1978).

TEUBER & LEMBKE (1983) recomendaram a utilização de uma mesma cultura por várias semanas e só depois a rotação, permitindo que bacteriófagos ativos contra certas culturas não em uso, sejam gradualmente diluídos. Segundo KEOGH (1972), o sistema

de rotação apresentou melhores resultados quando fermentos com pequeno número de linhagens, na forma pareada, foram utilizadas por períodos de 4-5 dias. THUNELL & SANDINE (1981) selecionaram 5 linhagens iniciadoras resistentes a bacteriófagos, através da exposição a soro de queijo. Essas linhagens foram utilizadas exclusivamente e quando um bacteriófago aparecia, a linhagem sensível era retirada, continuando-se com as outras 5. Segundo os autores, a prática de rotação de um grande número de linhagens no fermento, é difícil, além de propiciar o aparecimento de novos bacteriófagos. O uso de culturas iniciadoras com múltiplas cepas é efetivo, quando as linhagens selecionadas podem resistir ao ataque de bacteriófagos, por um tempo suficientemente longo (HEAP & LAWRENCE, 1976). LIMSOWTIN *et al.* (1977) consideraram que o desconhecimento da composição do fermento pode, ainda, tornar difícil o estabelecimento de padrões de qualidade nos queijos.

HEAP & LAWRENCE (1976) estabeleceram que, através de testes, pode-se obter linhagens não relacionadas a bacteriófagos, com bom desempenho tecnológico. RICHARDSON *et al.* (1980) obtiveram melhor produção de ácido láctico, quando misturas indefinidas de linhagens foram trocadas por linhagens pares ou múltiplas de 5 ou 6 linhagens.

Segundo LAWRENCE *et al.* (1976), os bacteriófagos são isolados com maior frequência, nas fábricas em que o uso de culturas iniciadoras é constante, pois é grande a oportunidade para o aparecimento ou seleção de novos bacteriófagos.

2.5.3. BACTÉRIAS REISTENTES À BACTERIÓFAGOS

É muito importante, que se empreguem linhagens bacteriófago-resistentes em sistemas de rotação de culturas, e

para tal, pode-se utilizar "Bacteriophage Insensitive Mutants" (BIMs), obtidos por isolamento de colônias, que se desenvolvem após a exposição da cultura a bacteriófagos líticos (HULL, 1977 a). É essencial que os mutantes mantenham as propriedades fermentativas da cultura original. Segundo SANDINE (1977), é importante que se desenvolvam bactérias iniciadoras bacteriófagos tolerantes, no ambiente da planta de processamento, pela prática da adição de bacteriófagos a linhagens únicas e múltiplas.

As bactérias bacteriófago-resistentes podem originar-se espontaneamente, através de alterações nos sítios receptores da superfície celular, as quais impediriam a adsorção e penetração do DNA fágico no hospedeiro. Do mesmo modo, as culturas podem perder essa capacidade, espontaneamente (KING et al., 1983). Segundo esses autores, embora seja comum a ocorrência simultânea de linhagens bacteriófago-resistentes e produtoras lentas de ácido láctico, tais características não são geneticamente ligadas. MARSHALL & BERRIDGE (1976) conseguiram selecionar linhagens de lactococos resistentes a bacteriófagos e com produção rápida de ácido láctico.

FABRIZIO et al. (1989) selecionaram mutantes bacteriófago-resistentes a partir do crescimento das linhagens, em presença de bacteriófagos. Tais mutantes mostraram propriedades bioquímicas e microbiológicas, similares às da cepa parental, diferenciando-se somente pela nítida resistência a bacteriófagos. A ocorrência de mutantes bacteriófago resistentes pode também ser devida à mutagênese, induzida quimicamente (SINHA, 1980) ou por irradiação (GUDKOV et al., 1982).

Estudos recentes mostram, que determinadas características da superfície celular, levam à resistência a bacteriófagos (VALYASEVI et al., 1989; SIJTSMAL, 1990). VLEGELS & WOUTERS (1985) estudaram a composição da parede celular de mutantes resistentes tendo verificado maior conteúdo de proteínas e carboidratos, em comparação com a cepa original.

Algumas linhagens de lactococos possuem plasmídeos que determinam várias de suas características metabólicas, sendo, uma delas, a resistência a bacteriófagos, por sistema restrição/modificação ou por infecção abortiva (GAUTER & CHOPIN, 1987). Estudos recentes mostraram que lactococos transformantes que adquiriram resistência a bacteriófagos, através de mecanismos de infecção abortiva, mantiveram-se estáveis após 100 gerações e retiveram a mesma capacidade de produção de ácido que as linhagens parentais (HUGHES & McKAY, 1992). Diversos estudos têm sido feitos com o objetivo de conseguir cepas bacteriófago-resistentes, através de transconjugação envolvendo plasmídeos (SANDERS *et al.*, 1986; JARVIS, 1988; NEVE, 1988; HILL *et al.*, 1990; HILL *et al.*, 1991; CASEY *et al.*, 1992).

Estudos feitos por LIMSOWTIN & TERZAGUI (1976), mostraram que mutantes bacteriófago resistentes podem ser utilizados com sucesso como culturas iniciadoras, uma vez que se apresentaram estáveis por 9 meses; sua utilização pode ser feita, também, em rotação de culturas, em pares.

2.5.4. CULTURAS CONCENTRADAS

Culturas iniciadoras concentradas são definidas como culturas que crescem sob condições controladas, concentradas em pequenos volumes, que podem ser congeladas ou liofilizadas (GILLILAND, 1985). A utilização de culturas concentradas, as quais podem ser adicionadas diretamente aos tanques de processamento, fornecem uma alternativa à preparação prévia dos fermentos e uso de meios inibidores.

Há muitas vantagens no uso de tais culturas: a atividade da cultura pode ser monitorada e controlada, antes de ser enviada ao processamento; sistema de manutenção e replicagem

das culturas, na planta de processamento pode ser eliminado; a participação do laboratório no processo é menor e o estabelecimento de sistema de rotação de culturas é facilitado (STANLEY, 1977). Entre as desvantagens encontra-se a exigência de um espaço adequado, com temperaturas ultrabaixas, para a manutenção das culturas congeladas, de forma que não percam sua atividade (SPECK & GILLILAND, 1975).

Uma alternativa para o uso das culturas concentradas congeladas são as culturas liofilizadas, de mais fácil transporte e armazenamento, embora menos ativas que as congeladas, além de exigirem reativações através de repicagens intermediárias, em laboratório (YANG & SANDINE, 1979).

Atualmente existem fermentos liofilizados altamente concentrados, que podem ser inoculados diretamente aos tanques de processamento e algumas menos concentradas, recomendadas para adição direta ao fermento industrial (FURTADO, 1991).

2.5.5. SANITIZAÇÃO

A manutenção de um esquema de limpeza e sanitização de equipamentos, utensílios e ambiente de processamento é extremamente importante na indústria de laticínios. WATKINS *et al.* (1989) realizaram um estudo comparativo para determinar a efetividade do hipoclorito, de compostos de amônio quaternário e de germicidas, à base de iodo, na destruição de bacteriófagos de lactococos, concluindo que o hipoclorito é o mais eficiente para o uso em plantas de leite.

Com base nesse aspecto, recomenda-se que todos os equipamentos sejam sanitizados, com solução clorada, (200-300 ppm de cloro disponível), imediatamente antes do uso e ao final do processamento. Em caso de contaminação comprovada, com

bacteriófagos, uma limpeza completa é indicada, abrangendo todas as dependências e utensílios, utilizando-se uma solução com 500-1000 ppm de cloro livre (FURTADO, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 AMOSTRAS

Optamos por isolar bacteriófagos a partir de amostras de soro de queijo, provenientes de diversas produções, em diferentes indústrias, sem levar em consideração a fonte de contaminação de cada planta. As amostras foram coletadas de maneira aleatória, independente de queixas, quanto a possíveis prejuízos no poder acidificante dos fermentos utilizados nos laticínios.

Trinta e três amostras de soro de queijo (provolone, mozzarella, minas frescal, prato, ricota, edam, cobocó e cáccio) foram coletadas em 17 laticínios do estado de São Paulo (Franca, Colina, Olímpia, Itatiba, São José do Rio Preto, Batatais, Jundiaí, Pindamonhangaba, Bebedouro, Angatuba, São Miguel Arcanjo, Cerqueira César, Sorocaba e Anhembi) para investigar a presença de bacteriófagos e em caso positivo, isolá-los. As amostras de soro foram imediatamente resfriadas, transportadas em banho de gelo e mantidas em freezer (-18°C), até o momento das análises.

3.1.2. MICRORGANISMOS

Para os testes e isolamento de bacteriófagos foram utilizadas linhagens de *Lactococcus*, cedidas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas apresentando as seguintes procedências:

- ITAL 257 - *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (NCDO 1999)
- ITAL 265 - *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (NCDO 2003)
- ITAL 343 - *Lactococcus lactis* ssp *lactis* var *diacetylactis* (WIESBY 933)

Essas culturas foram reisoladas e testadas segundo HARRINGAN & MacCANCE (1976), para a confirmação da identidade e pureza.

A manutenção das culturas foi feita em tubos com 10 ml de leite desnatado reconstituído estéril, com um inóculo de 15% e congeladas em freezer, antes de acidificação, isto é, sem incubação. As transferências foram feitas de 3 em 3 meses, e a reativação foi realizada retirando-se a cultura do freezer e incubando-se a 30°C, até a coagulação do leite.

3.13. FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIAIS

Para a realização dos testes de atividade dos fermentos em presença de fagos, bem como outros testes de avaliação da sensibilidade a fagos, foram utilizados 12 tipos de fermentos comerciais fornecidos por 3 diferentes empresas, sendo 1 fermento simples e 11 fermentos mistos dos tipos O, D e BD (TABELA 3.1).

TABELA 3.1. Tipo e composição dos fermentos comerciais utilizados nos testes de sensibilidade a fagos.

TIPO DE FERMENTO		COMPOSIÇÃO
MISTO	O ₁	2-5% <i>L. lactis</i> e 95-98% <i>L. cremoris</i>
	O ₂	2 cepas <i>L. lactis</i> e 2 <i>L. cremoris</i>
	O ₂	3 cepas <i>L. lactis</i> e 2 <i>L. cremoris</i>
	O ₄	2 cepas <i>L. lactis</i> e 2 <i>L. cremoris</i>
	O ₅	<i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i>
	D ₁	80% <i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i> pouco <i>L. diacetylactis</i> .
	D ₂	80% <i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i> pouco <i>L. diacetylactis</i>
	BD ₁	70-80% <i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i> 15-30% <i>L. diacetylactis</i> , pouco <i>Leuconostoc</i>
	BD ₂	92-99% <i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i> menos 0,5% <i>L. diacetylactis</i> 1-8% <i>Leuconostoc cremoris</i>
	BD ₃	92-99% <i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i> menos 0,5% <i>L. diacetylactis</i> 1-8% <i>Leuconostoc cremoris</i>
	BD ₄	70-80% <i>L. lactis</i> e <i>L. cremoris</i> 15-30% <i>L. diacetylactis</i> pouco <i>Leuconostoc</i> .
	SIMPLES	100% <i>L. diacetylactis</i>

3.14. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.14.1. LEITE RECONSTITUÍDO ESTÉRIL 11%

Leite desnatado Molico (NESTLE).....	10,0g
Água destilada.....	82,0g

O leite foi dissolvido e esterilizado em autoclave a 121°C por 10 minutos.

3.14.2. MEIO M17 (Terzaghi e Sandine, 1975)

Extrato de carne.....	5,0g
Polipeptona.....	5,0g
Peptona de soja.....	5,0g
Ácido Ascórbico.....	0,5g
β -glicerofosfato de sódio.....	19,0g
Cloreto de Magnésio 1 M.....	1,0ml
Extrato de levedura.....	2,5g
Lactose.....	5,0g
Água destilada.....	1000ml

Mistura-se até a total dissolução, ajusta-se o pH para 7,1 $\pm$ 0,05 e esteriliza-se em autoclave a 121°C, por 15 minutos. Para a obtenção do meio sólido e semi-sólido, foram adicionados 12g e 7g de ágar por litro, respectivamente. Ao meio sólido foi adicionado CaCl_2 1M à concentração final de 10%. A lactose e o cloreto de cálcio foram autoclavados separadamente e adicionados posteriormente.

3.14.3. APT ÁGAR

Meio APT (APT BROTH - 10454 - MERCK).....	46,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000ml

3.14.4. SOLUÇÃO DE RINGER (HARRINGTON & MACCANCE, 1976)

Cloreto de Potássio.....	0,10g
Cloreto de Sódio.....	2,25g
Cloreto de Cálcio Dihidratado.....	0,12g
Bicarbonato de Sódio.....	0,05g
Água destilada.....	1000ml

3.14.5. ÁGUA PEPTONADA

Peptona Bacteriológica.....	1,0g
Água destilada.....	1000ml

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976)

Amostras de leite (10 ml) foram tituladas com solução de hidróxido de sódio N/9, usando-se 2 gotas de solução alcóolica de fenolftaleína 1%, como indicador. As amostras foram tituladas até o aparecimento de uma coloração rósea. O resultado foi expresso em graus Dornic, cada grau equivalente a 0,1 ml de solução de NaOH N/9 utilizada, permitindo, portanto, expressar a acidez em porcentagem de ácido láctico (OLIVEIRA, 1986).

3.2.2. TESTE DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO PELAS CULTURAS DE *Lactococcus lactis*.

Este teste foi conduzido em leite desnatado reconstituído a 11%, segundo metodologia descrita por ANDERSON & MEANWHEEL (1942). As amostras de soro de queijo, coletadas nos diferentes laticínios, foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 g e o sobrenadante filtrado através de membrana Millipore com poro 0,45 μ m. Para cada cultura testada, foram preparados 2 tubos controle e 5 tubos de teste, com 10 ml de leite cada. Nos tubos controle adicionaram-se 2% de cultura (18 horas) e nos tubos teste, além da cultura, adicionou-se 1 ml do soro de queijo filtrado. Os tubos foram incubados em banho-maria, a 30°C por 2 horas, seguidos de incubação a 35°C, por 4 horas. Em continuação, procedeu-se, à titulação com solução Dornic (NaOH N/9), para determinação da acidez titulável.

3.2.3. INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE BACTERÍOFAGOS ATRAVÉS DE PLACA DE LISE EM ÁGAR DUPLA CAMADA (HULL, 1977b)

Foram colocados em tubos de ensaio, 0,05 ml de CaCl_2 1M e 0,1ml da cultura específica a ser testada (culturas de *Lactococcus lactis* de 18 horas em M17 líquido a 30°C). A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir cada tubo foi adicionado de 3ml de meio M17 semi-sólido, fundido e resfriado a 50°C. Após ligeira agitação, o material foi vertido em placas de Petri contendo uma camada solidificada de meio M17 sólido. Após a solidificação da segunda camada, foi depositada sobre a superfície do meio, 1 gota das diversas amostras de soro para verificação da presença de bacteriófagos.

Os soros utilizados neste teste, foram aqueles obtidos segundo descrito em 3.2.2 (obtido por centrifugação à 3.000g/10 min.), possibilitando, no caso de baixos números de bacteriófagos na amostra industrial, a amplificação desses bacteriófagos na presença da bactéria hospedeira específica. As placas foram incubadas a 30°C, por 18 horas, quando foram observadas as zonas ou placas de lise causadas pelos bacteriófagos.

3.2.4. ISOLAMENTO E ESTOCAGEM DOS BACTERÍOFAGOS (TERZAGHI & SANDINE, 1975)

As placas de lise isoladas, foram removidas e transferidas para tubos contendo 6 ml de meio M17 líquido, 0,1 ml da cultura hospedeira (de 18 horas) e 0,05 ml de CaCl_2 1M. Os tubos foram incubados a 30°C, por 6 horas, quando observou-se se ocorria a lise celular. Esta é evidenciada pelo fato de o meio tornar-se límpido, em comparação com o controle, que se apresenta turvo, devido ao crescimento normal da bactéria. O conteúdo dos

tubos lisados foi filtrado através de membrana, e armazenado a 2-5°C.

3.2.5. AMPLIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

Alíquotas de 0,1 ml de suspensão de bacteriófagos isolados, foram transferidos para tubos estéreis contendo 0,1 ml da bactéria hospedeira, cultivada em caldo M17 a 30°C durante 18 horas, e 0,05 ml de CaCl_2 1M, e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos aproximadamente. A seguir, acrescentaram-se 3,0ml de meio M17 semi-sólido e o material foi vertido em placa de Petri contendo uma camada de meio M17 sólido. A placa foi incubada a 30°C durante 18 horas, quando observou-se lise confluenta. A essa placa adicionaram-se 5,0 ml de caldo M17, seguida de incubação a 5°C por 12 horas, sendo o caldo recolhido e guardado em frasco estéril, a 2-5°C. Essa metodologia foi utilizada para se manter um estoque de cada bacteriófago isolado (10^8 UFP - unidade formadora de placa).

3.2.6. TITULAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

A partir de 1,0 ml de suspensão de bacteriófagos isolados, foram feitas diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-10} , em solução de Ringer, e em seguida, misturou-se 0,1 ml das diferentes diluições, com 0,1 ml de suspensão da bactéria hospedeira em crescimento ativo e 0,05 ml de CaCl_2 1M. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos, quando se adicionaram ao tubo, 3 ml de M17 semi-sólido fundido. Após homogeneização, o material foi vertido em placas de Petri contendo

uma camada de M17 sólido. As placas foram incubadas a 30°C, por 18 horas, após o que foram feitas as contagens. O título de bacteriófagos, expresso em unidades formadoras de placas (UFP/ml), foi obtido multiplicando-se o número de placas de lise pelo inverso da diluição correspondente.

3.2.7. REATIVAÇÃO DOS FERMENTOS LIOFILIZADOS COMERCIAIS

Com uma espátula estéril, uma amostra de cada envelope foi coletada, ressuspensa em leite desnatado reconstituído e incubada a 20°C até a coagulação.

3.2.8. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE MISTURA DE BACTERIÓFAGOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO PELOS FERMENTOS COMERCIAIS.

Esse teste foi conduzido em leite reconstituído a 11%. Para cada fermento testado, foram preparados 1 tubo controle e 2 tubos teste para cada hora de fermentação. Nos tubos teste, inocularam-se 1% do fermento reativado e 0,5% de uma mistura de todos os bacteriófagos isolados das amostras coletadas nas indústrias. No tubo controle só foi inoculado fermento. Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C, e a cada hora, uma amostra de cada tubo foi titulada com NaOH. Foram feitas leituras até a oitava hora de fermentação.

3.2.9. ATIVIDADE FÁGICA EM FERMENTOS SUBMETIDOS À SUB-CULTIVO DIÁRIO.

Os fermentos reativados foram repicados diariamente, inoculando-se 1% da cultura ativa em leite, e incubados a 20°C até a coagulação. No primeiro dia, para cada cultura foram preparados 4 tubos: 1 controle e 3 testes. No tubo controle foi inoculado somente fermento, na proporção de 1%. Nos tubos teste, adicionou-se também 0,5% da solução da mistura de bacteriófagos. Na sequência dos testes, seguiu-se a metodologia descrita em 3.2.2.. O conteúdo do terceiro tubo teste, após a incubação, foi centrifugado a 3000 g/10 minutos, recuperando-se e armazenando-se o sobrenadante em refrigerador. No dia seguinte, a partir da segunda transferência foi adicionado aos tubos teste na proporção de 10%. Após o décimo dia de repicagem, os soros provenientes de cada fermento foram analisados, segundo o método descrito em 3.2.3, para verificação da presença de bacteriófagos. Para tal teste foram utilizadas culturas de *L. lactis*, *L. cremoris* e *L. diacetylactis* com as quais, isolamos os bacteriófagos.

3.2.10. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS A PARTIR DOS FERMENTOS COMERCIAIS

A partir dos fermentos comerciais reativados, foram feitas diluições sucessivas até 10⁻⁹, em água peptonada, e 1,0 ml de cada diluição foi plaqueada em profundidade em meio APT. Após colocação de sobrecamada, as placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas. A seguir foram isoladas colônias que foram inoculadas em leite até que se constatasse a coagulação.

3.2.11. SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DOS FERMENTOS COMERCIAIS AOS BACTERIÓFAGOS.

Os isolados foram transferidos para caldo M17 e incubados a 30°C, por 18 horas. As culturas foram então testadas, com cada um dos bacteriófagos, isolados a partir de amostras de soro das indústrias, através do teste de placa de lise, em ágar dupla camada, descrito no item 3.2.3., com um replicador múltiplo.

3.2.12. OBSERVAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS ISOLADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para a microscopia eletrônica foi empregada a técnica de coloração negativa, utilizando-se ácido fosfotúngstico (PTA) 1% a pH 7,0 segundo metodologia descrita por HERALD & ZOTTOLLA (1988). O material com bacteriófagos, objeto de análise, foi o obtido em 3.2.6, e observado em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS (EM 9S2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COLETADAS NAS INDÚSTRIAS

Os lactococos são responsáveis, primariamente, pela produção de ácido láctico durante a manufatura de derivados do leite, incluindo-se diversas variedades de queijos. A fermentação láctica é resultante do crescimento desses microrganismos no leite, que fermentam a lactose convertendo-a em glicose e galactose-6-fosfato, através da enzima fosfo- β -galactosidase. A glicose é, então, fermentada através da via da hexose difosfato, produzindo ácido láctico como principal produto final. A galactose-6-fosfato é utilizada através da via tagatose fosfato, produzindo uma quantidade adicional de ácido láctico (SANDINE, 1985).

Levando em consideração os dados da literatura, uma redução de 10% ou mais na quantidade de ácido láctico produzido por uma cultura, crescida em leite, na presença de amostra suspeita, é tida como indicação de bacteriófagos. Assim sendo, decidimos iniciar nossas investigações de bacteriófagos nas amostras em que esse resultado fosse positivo, isto é, existisse uma diferença de acidez produzida pela cultura quando em presença da amostra. Desse modo eliminaríamos as amostras negativas, além de poder avaliar a efetividade desse método de detecção de bacteriófagos.

Nessa investigação, utilizamos somente 1 linhagem de cada subespécie de *Lactococcus lactis*: *L. lactis*, *L. diacetylactis* e *L. cremoris*.

Analisando-se os resultados obtidos em nosso trabalho, a partir dos testes de inibição da produção de ácido láctico, pela presença de bacteriófagos, nas amostras de soro adicionadas aos tubos teste, pudemos observar o seguinte: por

diversas vezes a amostra adicionada ao leite, a ser fermentado pelas culturas, provocou uma queda na produção de ácido láctico, e, portanto, uma menor medida em graus Dornic (TABELAS 4.1, 4.2 e 4.3).

TABELA 4.1. Acidez titulável (°D) de leite fermentado por *Lactococcus cremoris* na presença de amostra de soro de queijo coletado em indústrias de leite.

AMOSTRA	CONTROLE	TESTE	DIFERENÇA DE ACIDEZ (°D)	PLACA DE LISE
A ₁	52	32	38,4	-
A ₂	63	40	36,5	-
B ₁	56	42	25,0	-
B ₂	40	30	25,0	-
C ₁	57	34	40,3	-
D ₁	51	46	9,8	-
E ₁	54	38	29,6	-
E ₂	36	25	30,5	-
F ₁	49	34	30,6	-
F ₂	44	38	13,6	-
G ₁	50	36	24,0	-
H ₁	49	42	14,2	-
I ₁	46	29	36,9	-
I ₂	38	38	0,0	-
J ₁	47	32	31,9	-
K ₁	43	63	-23,2	-
K ₂	40	34	15,0	-
F ₃	47	45	4,2	-
B ₃	60	36	28,0	-
L ₁	47	32	31,9	-
L ₂	56	60	-7,1	-
L ₃	48	30	37,5	-
M ₁	50	38	24,0	-
N ₁	54	32	40,7	-
O ₁	48	28	41,6	-
P ₁	53	36	32,1	-
Q ₁	59	39	33,9	-
Q ₂	60	39	35,0	-
Q ₃	49	39	20,4	-
Q ₄	63	43	31,7	-
Q ₅	60	41	31,6	-
Q ₆	60	39	35,0	-
Q ₇	69	43	37,6	-

TABELA 4.2. Acidez titulável de leite fermentado por *Lactococcus lactis* na presença de amostra de soro de queijo coletado em indústrias de leite.

AMOSTRA	CONTROLE	TESTE	DIFERENÇA DE ACIDEZ (‰)	PLACA DE LISE
A ₁	53	38	28,3	-
A ₂	50	32	36,0	-
B ₁	59	59	0,0	-
B ₂	42	32	23,8	-
C ₁	51	30	41,1	5+ *
D ₁	53	46	13,2	-
E ₁	50	36	28,0	-
E ₂	33	27	18,1	5+ *
F ₁	44	34	22,7	5+ *
F ₂	52	36	30,7	-
G ₁	50	36	28,0	-
H ₁	48	38	20,8	2+ *
I ₁	45	28	37,7	-
I ₂	46	38	17,4	-
J ₁	33	26	21,2	6+ *
K ₁	51	51	0,0	5+ *
K ₂	47	34	27,6	-
F ₃	46	39	15,2	-
B ₃	48	32	33,3	-
L ₁	47	30	36,1	4+ *
L ₂	56	49	12,5	1+ *
L ₃	43	32	25,5	4+ *
M ₁	47	38	19,1	-
N ₁	55	34	38,1	-
O ₁	50	30	40,0	5+ *
P ₁	53	32	39,6	-
Q ₁	60	41	31,6	5+ *
Q ₂	58	36	37,9	-
Q ₃	51	41	19,6	-
Q ₄	60	39	35,0	-
Q ₅	62	36	41,9	-
Q ₆	62	32	48,3	1+ *
Q ₇	64	41	35,9	3+ *

(*) - Número de repetições a partir dos quais foi observada a formação de placas de lise.

TABELA 4.3 Acidez titulável de leite fermentado por *Lactococcus diacetylactis* na presença e ausência de amostra de soro de queijo coletado em indústrias de leite.

AMOSTRA	CONTROLE	TESTE	DIFERENÇA DE ACIDEZ (‰)	PLACA DE LISE
A ₁	57	38	33,3	-
A ₂	56	38	32,1	-
B ₁	59	51	13,5	-
B ₂	43	38	11,6	-
C ₁	56	47	16,1	-
D ₁	60	51	15,0	-
E ₁	56	40	28,5	-
E ₂	46	36	21,7	-
F ₁	50	36	28,0	-
F ₂	55	40	27,2	-
G ₁	59	38	35,6	-
H ₁	44	40	9,1	-
I ₁	49	34	30,6	-
I ₂	51	45	11,7	-
J ₁	46	32	30,4	-
K ₁	46	53	-15,2	-
K ₂	43	38	11,6	-
F ₃	52	53	-1,9	-
B ₃	55	40	27,3	-
L ₁	57	32	43,8	-
L ₂	62	57	8,1	-
L ₃	45	40	11,1	-
M ₁	56	38	32,1	5+ *
N ₁	59	32	45,7	-
O ₁	52	38	26,9	-
P ₁	56	38	32,1	5+ *
Q ₁	64	43	32,8	5+ *
Q ₂	61	42	31,1	3+ *
Q ₃	43	36	16,2	-
Q ₄	65	43	33,8	-
Q ₅	62	43	30,6	-
Q ₆	66	43	34,8	-
Q ₇	65	41	58,5	-

(*) - Número de repetições a partir dos quais foi observada a formação de placas de lise.

Por esses resultados, poderíamos supor que todas as amostras coletadas, estavam contaminadas com partículas fágicas específicas para as culturas puras, com as quais estávamos trabalhando, e, portanto, iríamos isolar bacteriófagos para as 3 subespécies empregadas.

Entretanto, o soro produzido a partir de cada crescimento na presença das amostras coletadas na indústria, quando submetido ao teste de placa de lise, para constatar a presença de bacteriófagos, apresentou resultados variados e nem sempre foi observada a presença de bacteriófagos.

No caso do crescimento do *L. lactis* (TABELA 4.2) e do *L. diacetylactis* (TABELA 4.3), a relação entre a diferença de acidez obtida nos tubos controle e teste foram semelhantes, mas nem sempre associada com a presença de bacteriófagos. Podemos notar alguns casos de presença de bacteriófagos em todos os tubos de repetição de uma mesma amostra (5+), havendo casos em que nem todas as repetições apresentaram bacteriófagos, variando de (1+) a (4+). Já em relação ao crescimento do *L. cremoris* (TABELA 4.1), embora a diferença de acidez entre controle e teste ter sido uma constante, não conseguimos obter resultados positivos nos testes de placa de lise.

Esses resultados indicam que, pelo menos em nossas condições experimentais, não foi possível, prever a presença de bacteriófagos, em amostras provenientes da indústria, através da verificação de depressão de 10% ou mais da capacidade acidificante em presença de amostra suspeita de bacteriófagos, conforme afirma a literatura. Além do fato de constantes quedas nos valores de acidez, nem sempre estarem relacionadas com a presença de bacteriófagos, (74% dos casos), podemos notar, na TABELA 4.2, que a amostra K₁, embora não tenha causado queda de acidificação, na fermentação do leite pelo *L. lactis*, mostrou atividade fágica em teste de placa de lise.

É possível supor que a presença de outros agentes

inibidores que não bacteriófagos, como antibióticos ou sanitizantes presentes nas amostras oriundas das indústrias, sejam os responsáveis pelas diferenças de acidez observadas, sem que se detectasse a presença de bacteriófagos. Essa suposição, entretanto, é improvável, uma vez que a grande maioria das amostras, oriundas de diferentes laticínios, comportou-se de forma muito semelhante. Por outro lado, essa hipótese não deve ser totalmente descartada porque a coleta das amostras não foi acompanhada e não foram realizados os testes para a verificação da presença de outros inibidores.

4.2. ISOLAMENTO DOS BACTERÍOFAGOS

Para tal investigação foi utilizada 1 linhagem de cada subespécie de lactococos: *L. lactis*, *L. cremoris* e *L. diacetylatis*. Desse modo, isolamos 16 bacteriófagos, 12 específicos para *L. lactis*, 3 específicos para *L. diacetylatis* e 1 capaz de lisar ambas as subespécies (TABELA 4.4).

A infecção de 2 subespécies por um mesmo fago já foi reportada por CHOPIN *et al.* (1976). Não observamos atividade fágica para *L. cremoris* em nenhuma amostra analisada, o que, segundo LAWRENCE *et al.* (1976), deve-se às características dos bacteriófagos de *L. cremoris*, que apresentam maior espécie-especificidade do que os bacteriófagos de *L. lactis*.

Tentamos, também, isolar bacteriófagos diretamente, a partir de amostras provenientes dos laticínios, não sendo bem sucedidas as tentativas em alguns casos. Por esse motivo, optamos por usar o soro resultante do teste descrito em 3.2.1., que possibilitaria a amplificação dos bacteriófagos existentes nas amostras provenientes da indústria, quando em presença da respectiva bactéria hospedeira. Tal procedimento mostrou-se

adequado, pois, constatamos a ocorrência de placas de lise congruentes indicando alta concentração fágica, evitando falsos resultados negativos.

TABELA 4.4. Relação do tipo de amostras avaliadas nos diferentes laticínios e atividade fágica observada nas diferentes amostras.

LACTICÍNIO-PRODUTO	CÓDIGO DA AMOSTRA	ATIVIDADE FÁGICA (código do fago)
A - PROVOLONE	A ₁	-
MOZARELA	A ₂	-
B - MOZARELA	B ₁	-
-	B ₂	-
- *	B ₃	-
C - MOZARELA	C ₁	c ₁ (<i>L. lactis</i>)
D - MINAS FRESCAL	D ₁	-
E - PRATO	E ₁	-
MOZARELA	E ₂	e ₂ (<i>L. lactis</i>)
F - MOZARELA	F ₁	f ₁ (<i>L. lactis</i>)
PARMESÃO	F ₂	-
PRATO *	F ₃	-
G - MOZARELA	G ₁	-
H - -	H ₁	h ₁ (<i>L. lactis</i>)
I - MINAS FRESCAL	I ₁	-
MOZARELA	I ₂	-
J - MOZARELA	J ₁	j ₁ (<i>L. lactis</i>)
K - -	K ₁	k ₁ (<i>L. lactis</i>)
-	K ₂	-
L - MOZARELA	L ₁	l ₁ (<i>L. lactis</i>)
MINAS FRESCAL	L ₂	l ₂ (<i>L. lactis</i>)
RICOTA	L ₃	l ₃ (<i>L. lactis</i>)
M - MOZARELA	M ₁	m ₁ (<i>L. diacetylactis</i>)
N - MOZARELA	N ₁	-
O - MOZARELA	O ₁	o ₁ (<i>L. lactis</i>)
P - MINAS FRESCAL	P ₁	p ₁ (<i>L. diacetylactis</i>)
Q - PROV/MOZARELA	Q ₁	q ₁ (<i>L. lactis</i> e <i>L. diacetylactis</i>)
EDAM	Q ₂	q ₂ (<i>L. diacetylactis</i>)
COBOCÓ	Q ₃	-
MINI-LANCHE	Q ₄	-
PROV/MUZ/CACCIO	Q ₅	-
PRATO	Q ₆	q ₆ (<i>L. lactis</i>)
PROVOLONE	Q ₇	q ₇ (<i>L. lactis</i>)

(*) 6 meses depois

(-) produção não informada

Esse teste foi importante também para avaliar a real influência dos bacteriófagos na inibição da produção de ácido láctico, uma vez que a simples diferença de 10% entre os valores de acidificação, não foram suficientes para indicar a presença de bacteriófagos nas amostras.

Os bacteriófagos produziram placas de lise circular, com bordas nítidas e interior livre de crescimento bacteriano, o que demonstra a virulência dos bacteriófagos contra as bactérias testadas. Para a preparação dos estoques dos bacteriófagos, foi feita a amplificação dos isolados, obtendo-se títulos em torno de 10^8 UFP/ml (unidades formadoras de placa). A conservação desses estoques por 4 meses, não alterou o poder infectante das partículas.

Os dados evidenciaram a presença de atividade fágica em 65.0% das indústrias avaliadas, utilizando-se apenas 1 linhagem de cada subespécie de lactococos. Considerando-se as características de espécie-especificidade dos bacteriófagos, provavelmente, utilizando-se um maior número de linhagens de bactérias, o número de bacteriófagos isolados seria maior. Na FIGURA 4.1, podemos observar uma foto em microscopia eletrônica, de um dos bacteriófagos específicos para *L. lactis*, isolado a partir de amostra de indústria.

Esses resultados, ainda que avaliados apenas do ponto de vista qualitativo, mostram que a presença de bacteriófagos na indústria paulista de queijos é real, sendo portanto, essencial a adoção de medidas preventivas, principalmente sanitização, adequado manejo do soro dentro da indústria e rotação de culturas, para que os níveis de contaminação não atinjam valores preocupantes.

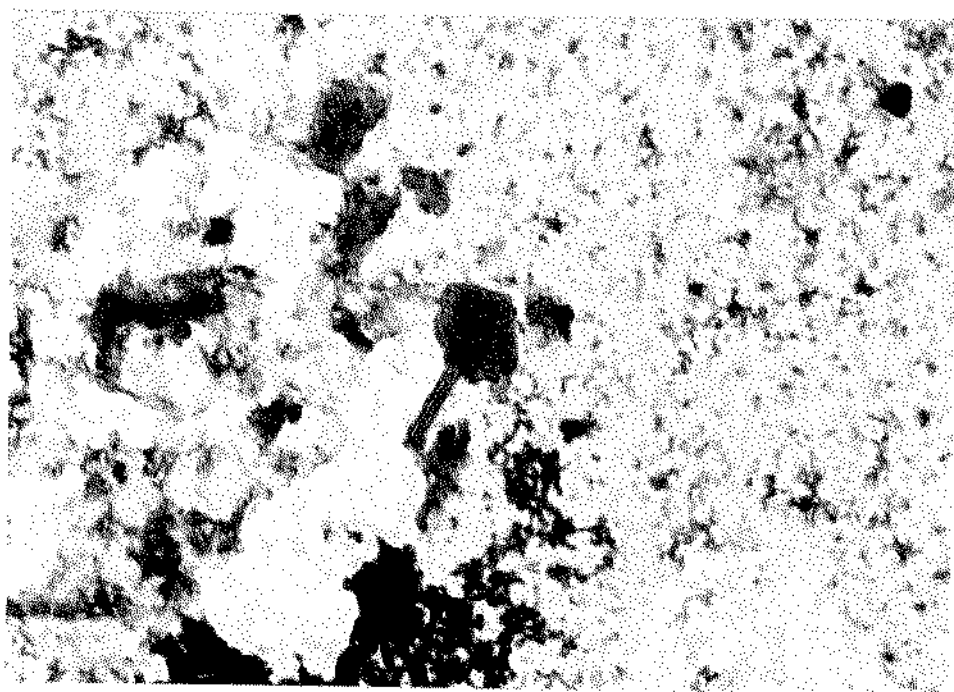


FIGURA 4.1. Fotomicrografia de bacteriófago de *L. lactis* isolado da indústria (Microscopia eletrônica de transmissão - 57.000 $\times$).

Esses resultados, ainda que avaliados apenas do ponto de vista qualitativo, mostram que a presença de bacteriófagos na indústria paulista de queijos é real, sendo portanto, essencial a adoção de medidas preventivas, principalmente sanitização, adequado manejo do soro dentro da indústria e rotação de culturas, para que os níveis de contaminação não atinjam valores preocupantes.

4.3. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE MISTURA DE BACTERÍOFAGOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO PELOS FERMENTOS COMERCIAIS

Os valores de acidez, obtidos após 8 horas de incubação, variaram de um fermento comercial para outro, o que já era esperado, uma vez que possuem diferentes composições (TABELA 4.5). Podemos notar diferenças significativas de acidez entre o controle e o teste somente no caso de dois fermentos do tipo O, os fermentos O₃ e O₄.

TABELA 4.5. Acidez titulável (°D) do leite fermentado por diferentes fermentos comerciais na presença (Teste) e ausência (Controle) da mistura de bacteriófagos.

FERMENTO	CONTROLE	TESTE
BD ₁	94	95
BD ₂	75	75
BD ₃	87	87
BD ₄	82	82
D ₁	87	88
D ₂	86	85
O ₁	64	64
O ₂	57	58
O ₃	56	51
O ₄	72	52
O ₅	83	83
SIMPLES	62	63

*Leite fermentado por 8 horas a 30°C.

Embora os outros fermentos não tenham sofrido diferenças no poder de acidificação, quando em presença de bacteriófagos, isso não garante que, com o uso constante em uma indústria, esse comportamento seja mantido. Embora os níveis de acidez não tenham sido comprometidos nesse teste, os bacteriófagos podem ter-se multiplicado e atingido níveis maiores que o inicial, sem no entanto afetar as bactérias fermentativas rápidas. Essa resistência parcial aos bacteriófagos pode ter criado uma situação de semi-estabilidade do fermento, passível de alteração durante subcultivos. O desbalanço das cepas pode elevar a proporção de linhagens sensíveis expostas à ação lítica dos bacteriófagos que foram mantidos.

Segundo STADHOUDERS & LEENDERS (1984), testes com períodos menores de incubação (6 horas a 30°C) são mais adequados para a avaliação do comportamento de fermentos, na presença de bacteriófagos, em comparação com 24 horas a 20°C. Em períodos mais curtos, é menos provável a adaptação do fermento em contato com os bacteriófagos, considerando-se a existência e seleção de linhagens

resistentes. Diante dos resultados obtidos, podemos concluir, que se os fermentos comerciais analisados não sofrerem contaminação por bacteriófagos, até a fase de utilização industrial, a presença de bacteriófagos, no leite, não causaria danos ao processamento.

Uma melhor avaliação do efeito dos bacteriófagos, no comportamento dos fermentos, pode ser feita com base nos dados da TABELA 4.6, onde verificamos a diferença percentual de acidez, entre o controle e o teste, em função do tempo de fermentação.

No caso dos fermentos O₂ e O₄, notamos que as diferenças de acidificação foram acentuando-se com o tempo. Os fermentos O₂ e O₃ apresentaram valores de acidez final menores do que todos os demais (TABELA 4.5), e, talvez, por esse motivo, a evidência do comprometimento causado pelos bacteriófagos não tenha sido tão clara. Ao contrário, no O₄, nota-se uma nítida diferença tanto na acidez final quanto ao longo do tempo.

TABELA 4.6. Diferença percentual entre a acidez titulável (°D) do leite fermentado por diferentes fermentos comerciais na presença e ausência de bacteriófagos, em função do tempo de incubação.

FERMENTO	Diferença de acidez (%)		
	4 horas	6 horas	8 horas
BD ₁	0,0	0,0	0,0
BD ₂	0,0	0,0	0,0
BD ₃	0,0	0,0	0,0
BD ₄	0,0	0,0	0,0
O ₁	0,0	0,0	0,0
O ₂	4,4	0,0	0,0
O ₃	0,0	8,6	9,2
O ₄	4,0	14,0	28,0
O ₅	0,0	0,0	0,0
D ₁	0,0	0,0	0,0
D ₂	0,0	0,0	0,0
SIMPLES	0,0	0,0	0,0

Uma vez que o desenvolvimento acelerado de acidez depende da presença de linhagens fermentadoras rápidas, podemos sugerir que o fermento 04 mostrou-se mais prejudicado porque justamente suas linhagens fermentadoras rápidas, foram as que mostraram sensibilidade aos bacteriófagos. Ainda assim, não podemos concluir que esses fermentos seriam inadequados à produção de queijos em uma indústria. Segundo STADHOUDERS & LEENDERS (1984), embora no cultivo de culturas iniciadoras, a contaminação com poucos bacteriófagos possa afetar significativamente os níveis de acidez, o nível crítico de contaminação por bacteriófagos, na fabricação de queijos, é muito maior, devido às limitações impostas pelo coágulo, na dispersão de bacteriófagos para as diferentes bactérias presentes no fermento.

Por outro lado, a multiplicação fágica pode elevar os níveis de bacteriófagos e mesmo não havendo um imediato comprometimento da produção, se não forem tomadas medidas preventivas podem ocorrer transtornos posteriores.

4.4.ATIVIDADE FÁGICA EM FERMENTOS SUB-CULTIVADOS DIARIAMENTE

Os fermentos lácticos mesofílicos, normalmente, são constituídos de diferentes cepas de lactococos que podem conter células variantes. O subcultivo (repicagem) pode predispor uma cepa a dominar as outras, alterando a composição inicial do fermento (LIMSOWTIN *et al.*, 1978). COLLINS (1981) atribui essa habilidade de domínio de algumas cepas, durante o subcultivo, a diversos fatores: diferenças na duração das fases de latência de crescimento, diferenças na razão de crescimento, diferenças na tolerância a produtos finais de metabolismo, variações nos requerimentos nutricionais e variações no estado fisiológico das células. Levando-se em consideração tais aspectos, torna-se evidente que um mesmo fermento não apresentará o mesmo

comportamento, em presença de bacteriófagos, quando submetido a repicagens sucessivas, em comparação com o comportamento apresentado em apenas 8 horas de fermentação.

O teste de atividade fágica, em fermentos repicados diariamente foi feito com 3 fermentos mistos (Dz, BD₁ e O₁) e um simples (*L. diacetylactis*) (TABELA 4.7).

TABELA 4.7. Diferença percentual entre a acidez titulável (°D) do leite fermentado na presença e ausência de bacteriófagos por fermentos sub-cultivados diariamente.

SUB-CULTIVO	DIFERENÇA DE ACIDEZ TITULÁVEL (°D)			
	FERMENTO COMERCIAL			SIMPLES (<i>L. diacetylactis</i>)
	BD ₁	Dz	O ₁	
1	3,7	0,0	2,0	7,0
2	3,7	0,0	2,0	5,0
3	7,1	2,0	0,0	0,0
4	5,9	0,0	9,8	6,0
5	3,9	2,0	0,0	4,1
6	7,8	0,0	2,2	4,4
7	8,2	0,0	14,0	8,1
8	0,0	0,0	6,1	0,0
9	0,0	0,0	12,2	4,1
10	+ 0,0	+ 0,0	12,2	0,0
11	+ 11,0	+ 15,7	0,0	0,0
12	+ 10,0	+ 7,8	0,0	4,1
13	+ 0,0	+ 0,0	0,0	0,0
14	+ 13,2	+ 3,9	4,1	0,0
15	+ 0,0	+ 0,0	0,0	0,0
16	+ 11,0	+ 5,9	10,9	0,0
17	+ 7,8	+ 0,0	7,8	0,0
18	+ 19,0	+ 2,0	4,1	0,0
19	+ 20,7	+ 3,9	17,6	0,0
20	+ 15,8	+ 1,9	2,0	0,0

(+) Presença de bacteriófagos

Até o décimo dia de repique notamos que somente o fermento O₁ apresentou diferença na capacidade de acidificação (maior ou igual a 10%) entre controle e o teste, e a partir desse repique, nota-se diferenças também no BD₁ e Dz. No entanto, as diferenças no fermento Dz não se mantêm significativas. Fazendo as análises dos soros provenientes da fermentação do leite pelos fermentos, no 10º dia de repique, verificamos a presença de bacteriófagos nos soros obtidos a partir do desenvolvimento dos fermentos BD₁ e Dz. Esses bacteriófagos mostraram-se sensíveis às linhagens de lactococos, a partir das quais, fizemos o isolamento das amostras das indústrias e, portanto, supõe-se que são os mesmos adicionados no início do experimento.

Com relação ao fermento Dz, podemos notar que não houve queda na capacidade de acidificação (TABELA 4.7) mas, por outro lado, notamos a presença de bacteriófagos nos soros obtidos até o último dia de teste, mostrando que o bacteriófago continuou se mantendo nas repicagens diárias, embora sem provocar queda na capacidade de acidificação do fermento.

Os bacteriófagos que se mantiveram no fermento BD₁ mostraram sensibilidade à cultura padrão 265 (*L. lactis*) e as do fermento Dz para a 343 (*L. diacetylactis*). O que pudemos, após 20 sub-cultivos sucessivos, é que houve a manutenção de bacteriófagos no fermento Dz, sem entretanto alterar sua capacidade de acidificação. Tal resultado concorda com os dados obtidos por SANDINE et al. (1960), o qual observou que, em caso de contaminação de fermentos mistos, as linhagens de *L. lactis* e *L. cremoris* que não tenham sido atingidas pelos bacteriófagos específicos para *L. diacetylactis*, continuem a produção de acidez em níveis normais. Esse tipo de infecção, entretanto, certamente vai provocar queda no nível de diacetil produzido, com consequente prejuízo no comportamento aromatizante do fermento. Além disso, a manutenção desse bacteriófago "não aparente", em uma planta de processamento pode trazer consequências desastrosas caso sejam introduzidas no processo, culturas produtoras de ácido sensíveis a tal infecção.

Em relação ao fermento BD₁ nota-se uma variação na capacidade de acidificação, influenciada pelas transferências e provavelmente pela ação dos bacteriófagos, mostrando portanto, que a composição do fermento se alterou com os subcultivos.

O fermento O₁ embora não verificada a manutenção do bacteriófago após repicagens sucessivas, mostra diferenças expressivas de capacidade fermentativa. No caso dos fermentos, que não mantiveram os bacteriófagos nas repicagens sucessivas, fica demonstrada a importância da rotação de culturas, uma vez que, em tais fermentos, não havia cepas sensíveis a ponto de aumentar o nível de infecção, e os bacteriófagos adicionados perderam-se durante as repicagens, por falta de hospedeiros.

4.5. SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DOS FERMENTOS COMERCIAIS AOS BACTERIÓFAGOS

Sabendo-se que um dos métodos utilizados pela indústria para controlar os bacteriófagos é a rotação de culturas, torna-se extremamente importante conhecer o nível de sensibilidade das linhagens componentes dos fermentos, em relação aos bacteriófagos existentes na própria indústria.

Esse teste, cujos resultados encontram-se na TABELA 4.8, foi feito para os fermentos BD₁, Dz, O₃ e O₄, que apresentaram diferenças na capacidade de acidificação em presença de bacteriófagos, em testes anteriores. A partir do fermento BD₁ foram isoladas e selecionadas, de forma aleatória, 56 culturas, das quais 13 mostraram sensibilidade aos bacteriófagos da nossa coleção (TABELA 4.8), o que representa 23% de sensíveis. A partir do fermento Dz, foram isoladas 43 bactérias, 40% das quais mostraram-se sensíveis a algum dos bacteriófagos testado.

Com relação aos fermentos O₃ e O₄, as cepas componentes foram cedidas em cultura pura pelo fornecedor, não havendo necessidade de reisolar. Das 5 cepas constituintes do fermento O₃, somente uma mostrou sensibilidade aos bacteriófagos testados. No fermento O₄, constituído de 4 cepas, 2 cepas apresentaram-se sensíveis. Na TABELA 4.8, estão listadas apenas as bactérias isoladas, componentes de cada fermento, que mostraram sensibilidade a pelo menos um dos bacteriófagos de nossa coleção.

HENNING *et al.* (1968), em seus experimentos, atribuíram a ausência de bacteriófagos ativos contra certas linhagens, ao fato de essas linhagens não terem sido utilizadas em fábricas nas quais se isolou seus bacteriófagos testados. Com base nessas observações, podemos supor que os fermentos testados tenham sido recentemente utilizados nas fábricas de onde foram isolados os bacteriófagos de nossa coleção.

Podemos notar, que determinados bacteriófagos de nossa coleção, não se mostraram infectivos para nenhuma das bactérias isoladas a partir dos fermentos (c₁, f₁, h₁, q₆ e q₇). Ao mesmo tempo, notamos que o fago p₁, originalmente isolado para um *L. diacetylactis* mostrou infectividade para a quase totalidade das bactérias isoladas, colocando em questão o grau de especificidade desse fago. Entretanto, as condições de reativação à qual o fermento foi submetido antes do isolamento (à temperatura de 22°C), não permitiu condições para que a pequena porcentagem dessa subespécie, contida originalmente no fermento, fosse alterada a ponto de existir em maioria quando isoladas as culturas.

TABELA 4.8. Sensibilidade fágica das bactérias isoladas dos fermentos comerciais.

Fermento/cultura		Bacteriófago														
		c1	e2	f1	j1	k1	l1	l2	l3	m1	o1	p1	q1	q2	q6	q7
BD ₁ -	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	S	-	S	S	S	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	S	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	S	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	S	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
	9	-	-	-	S	S	-	-	-	-	S	S	S	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	S	-	-	-
D ₂ -	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	S	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	S	-	-
O ₃ -	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
O ₄ -	1	-	S	-	-	S	S	-	S	S	-	S	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	S	S	-	-	-

(S) - Sensibilidade

(-) - Resistência

Segundo CHOPIN *et al.* (1975), linhagens resistentes podem apresentar sensibilidade a um pequeno número de bacteriófagos (provavelmente não isolados em nosso trabalho) ou talvez sejam mutantes fago resistentes, o que explicaria o fato da não sensibilidade de algumas bactérias aos bacteriófagos avaliados nessas condições.

Levando em consideração que os bacteriófagos testados foram isolados a partir de várias indústrias, podemos considerar como boas as características dos fermentos testados em relação à resistência aos bacteriófagos, ainda que contenham cepas sensíveis, uma vez que foram testados, na presença de uma mistura de bacteriófagos procedentes de diferentes fábricas. Em cada indústria individual, esses fermentos teriam provavelmente um melhor desempenho.

Com base nos dados de sensibilidade individual aos bacteriófagos, podemos estabelecer uma relação com os resultados obtidos nos demais testes.

No caso dos fermentos BD₁ e Dz, pudemos notar que o número de bactérias sensíveis a bacteriófagos, foi pequeno o bastante para não causar quedas significativas na capacidade de acidificação do fermento (maior ou igual 10%), em 8 horas de teste (TABELA 4.5). Os fermentos O₃ e O₄, ao contrário, apresentaram uma relação entre as cepas resistentes e sensíveis, suficiente para causar diminuição na capacidade de acidificação do fermento. O fermento O₃, em que somente 1 das 5 cepas componentes mostrou-se sensível, apresentou uma diferença na capacidade de acidificação de apenas 9%, enquanto que o fermento O₄ que teve metade de suas cepas componentes sensíveis a algum fago da coleção, apresentou queda acentuada na capacidade de acidificação, notada logo nas primeiras horas de teste. Esses resultados mostram que as cepas resistentes não foram suficientemente rápidas na produção de ácido láctico, de modo a reparar o dano causada pela queda de produtividade das cepas sensíveis, em 8 horas de teste. Por outro

lado, não se pode descartar uma possível recuperação do nível de capacidade de acidificação desse fermento em 24 horas, uma vez que o nível da população passaria a manter-se estável, depois que todas as células sensíveis fossem lisadas.

Analisando os resultados da influência dos bacteriófagos nos fermentos sob repicagem diária, notamos quedas significativas na capacidade de produção de ácido láctico do fermento BD₁, provocada provavelmente pela influência dos bacteriófagos sobre as bactérias sensíveis presentes. Sob repicagens constantes, o equilíbrio entre as cepas presentes foi alterado, predominando justamente aquelas sensíveis a bacteriófagos.

5. CONCLUSÕES

1. Foi possível isolar bacteriófagos de *Lactococcus lactis*, em amostras de soro de queijo de 68% das indústrias leite do Estado de São Paulo avaliadas.
2. A análise de acidez revelou que 74% das amostras de soro de queijo, provocaram uma diminuição na capacidade acidificante, das bactérias lácticas usadas, maior que 10%, sem, no entanto, constatar a presença de bacteriófagos. Este parâmetro, portanto, não permite a avaliar corretamente a presença de bacteriófago em uma amostra.
3. A prevalência de bacteriófagos em amostra de soro de queijo, mostrou-se ser maior para *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* do que para *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*, não sendo isolados bacteriófagos para *L. lactis* ssp. *cremoris*.
4. A presença de bacteriófagos provenientes da indústria, não ocasionou inibição da produção de ácido láctico, da maioria dos fermentos lácticos comerciais usados nos estudos, em 8 horas de fermentação.
5. Sob condições de sub-cultivo diário, os fermentos lácticos mantêm as partículas fágicas, mesmo não interferindo na capacidade de acidificação, após 20 sub-cultivos
6. O comportamento de acidificação dos fermentos lácticos foi variável após 20 sub-cultivos repicagens em presença de bacteriófagos.
7. A relação entre bactérias sensíveis e bactérias resistentes aos bacteriófagos presentes em fermentos lácticos comerciais foi variável.

8. Alguns bacteriófagos isolados da indústria não se mostraram infectivos à nenhuma das bactérias isoladas dos fermentos; um dos bacteriófagos isolado para *L. diacetylactis* mostrou infectividade para a maioria das bactérias isoladas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.H. Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. New York. 1959, 592p.
- AMER, S.; EL-KOUSSY, L.A.; GIRGIS, E.S. & EWAIS, S.M. Effect of type of starter culture on the proprieties of low fat baby Edam cheese during ripening. I. some chemical, microbiological and organoleptic proprieties. Egyptian Journal of Food Science 11(1/2): 39-44, 1983.
- ANDERSON, E.B. & MEANWELL, L.J. Journal of Dairy Research 13, 58, 1942. Apud. COX, W.A., 1980.
- ANDERSON, D.G.; OHLENDORF, D.H.; TAKEDA, Y. & MATTHENS, B.W. Structure of the cro repressor from bacteriophage gama and its interaction with DNA. Nature 290: 754-758, 1981.
- BABEL, F.J. Factors influencing acid production by cheese cultures. II. Influence of bacteriophage on acid production in the manufacure of cheddar and cottage cheese. Journal of Dairy Science 27(9): 597-606, 1946.
- BLACK, T.D. & STEENSON, L.R. Characterization of a mixed-strain dairy starter culture: occurrence of lysogeny and conjugative ability among indigenous strains. Journal Dairy Science 73 (supl 1), 1990.
- BOUSSEMAER, J.P.; SCHRAUWEN, P.P.; SOURROVILLE, J.L. & GUY, P. Multiple modification/restriction systems in lactic streptococci and their significance in define a phage-typing system. Journal of Dairy Research 47(3): 401-409, 1980.
- BRADLEY, D.E. Ultraestructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriological Reviews 31: 230-314, 1967.
- BRITO, C.C. Lactic starters: Their influence on physical and sensory quality of cheese. Alimentos 15(3): 61-65, 1990.
- BUDDE-NIEKIEL, A. & TEUBER, M. Electron microscopy of the adsorption of the bacteriophage to lactic acid bacteria. Milchwissenschaft 42(9): 551-554, 1987.
- CASEY, J.; DALY, C. & FITZGERALD, G.F. Controlled integration into the Lactococcus cromossome of the pCI829 - Encoded abortive infection gene from Lactococcus lactis ssp. lactis UC811. Applied Environmental Microbiology 58(10): 3283-3291, 1992.

- CAVETT, J.J. Biochemical and serological characters of three strains of *Streptococci* previously as *Streptococcus cremoris* isolated from deep-frozen peas after thawing. *Journal of Applied Bacteriology* 30(2): 377-381, 1967.
- CHAVARI, F.J.; NUNEZ, J.A.; PAZ, M. de & NUNEZ, M. Effect of lactic cultures on *Escherichia coli* in ewes milk stored at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 13(4): 309-314, 1991.
- CHOPIN, M.C.; CHOPIN, A. & ROUX, C. Definition of bacteriophage groups according to their lytic action on mesophilic lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* 32(6): 741-746, 1976.
- CHOPIN, M.C. Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *Journal of Dairy Research* 47(1): 131-139, 1980.
- COGAN, T. M. Some aspects of the metabolism of dairy starter cultures. *Irish Journal of Food Science Technology* 7: 1, 1982.
- COGAN, T.M. & DALY, C. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* Vol. 1, Fox, P. F. (Ed) Elsevier Applied Science Publisher Ltda. London, UK, p.179, 1987.
- COLLINS, E.B.; NELSON, F.E. & PARMELEE, C.E. The relation of calcium and other constituents of a defined medium to proliferation of lactic *Streptococcus* bacteriophage. *Journal Bacteriology* 60: 553-542, 1950.
- COLLINS, E.B. Behaviour and use of lactic streptococci and their bacteriophage. *Journal of Dairy Science* 45(4): 552-558, 1962.
- COVENEY, J.A.; FITZGERALD, G.F. & DALY, C. Detailed characterization and comparison of four lactic streptococcal bacteriophages based on morphology restriction mapping, DNA homology and structural proteins analyses. *Applied Environmental Microbiology* 53(7): 1439-1447, 1987.
- COX, W.A. Detection and enumeration of mesophilic lactic bacteriophage. *Bulletin of International Dairy Federation* 129: 29-34, 1980.
- DALY, C. The use of mesophilic cultures in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3): 297-312, 1983.
- DAOUST, D.R.; EL-BISI, H.M. & LITSKY, W. Thermal destruction kinetics of lactic streptococcal bacteriophage. *Applied Microbiology* 13(3): 478-485, 1965.

- DAVIES, L. & LAW, B.A. Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Elsevier Applied Science Publishers, London e New York, 1984.
- EDDY, D.W. & HULL, R.R. The effect of temperature on the multiplication of *Streptococcus cremoris* bacteriophage NZ104mg. Australian Journal of Dairy Technology 43(3/4): 48-52, 1987.
- ELLIS, E.L. & DELBRUCK, M. The growth of bacteriophage. Journal of General Physiology 22: 365, 1939. Apud. ZEHREN and WHITEHEAD, 1954.
- EVERSON, T.C. Control of phage in dairy plant. Bulletin of International Dairy Federation 263: 24-28, 1991.
- FABRIZIO, S.V. de; PARADA, J.L.; LEDFORD, R.A.; SOLARI, A. & BROWN, J. Mutante de *Streptococcus lactis* con resistencia a bacteriofagos aislados em Argentina y Estados Unidos de América. Revista Argentina de Microbiología 21(1): 1-8, 1989.
- FABRIZIO, S.V. de; LEDFORD, R.A.; SHIEH, Y.S.C.; BROWN, J. & PARADA, J.L. Comparasion of lactococcal bacteriophage isolated in the USA and Argentina. Journal of Food Microbiology 13(4): 285-294, 1991.
- FARAHAT, S.M.; EL-NESHAUWY, A. A.; GUIRGUIS, A.H.; RABIE, A.M. & ABDEL-BAKY, M.A. Growth and activity of some lactic streptococci cultivated on soy milk medium infected with bacteriophage. Nahrung 28(8): 797-807, 1984.
- FITZGERALD, G.F.; DALY, C.; BROWN, L.R. & GINGERAS, T.R. A new sequence specific endonuclease from *Streptococcus cremoris*. Nucleic Acids. Research 10: 8171-8179, 1982.
- FORD, H.F. & BABEL, F.J. Effect of incubation temperatures on the retention of bacteriophage by a culture of *Streptococcus lactis*. Journal of Dairy Science 33(6): 466-472, 1950.
- FREDERICK, I.A.; CROMIE, S.J.; DULLEY, J.R. & GILES, J.E. The effects of increased starter populations, added neutral proteinases and elevated temperature storage on cheddar cheese manufacture and maturations. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology 21(3): 191-203, 1986.
- FURTADO, M.M. A arte e a ciência do queijo. Editora Globo, São Paulo, 1991. 297p.
- GARVIE, E.I. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. Journal of Dairy Research 27: 283, 1960.

- GARVIE, E.I. & FARROW, J.A. *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* (Orla-Jensen) comb. nov. and *S. lactis* subsp. *diacetylactis* (Matuszewski et al.) nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32(4): 453-455, 1982.
- GASSON, M.J. & DAVIES, F.L. Prophage-cured derivatives of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Applied Environmental Microbiology* 40(5): 964-966, 1980.
- GAUTER, M. & CHOPIN, M.C. Plasmid-determined system for restriction and modification activity and abortive infection in *Streptococcus cremoris*. *Applied Environmental Microbiology* 53(5): 923-927, 1987.
- GILLILAND, S.E. Concentrated starter culture. In: *Bacterial starter culture for foods*. CRC Press Inc., New York, cap. 11 1985, p. 145-157.
- GRAHAM, D.M.; PARMELEE, C.E. & NELSON, F.E. The carrier state of lactic streptococcus bacteriophage. *Journal of Dairy Science* 35 (10): 813-822, 1952.
- GUDKOV, A.V.; DOKUKIN, V.M.; FORMICHEV, Y.U.K. & SEL'SKOV, A.W. Effect of bacteriophage on cheese manufacture. *Molochnaya Promyshlennost* 5: 7-12, 1976.
- GUDOKOV, A.V.; OSTROUMOV, L.A. & ODEGOV, N.I. Proc. XXI Int. Dairy Congress, Moscow, vol.1, Book 1, Mir Publisher, Moscow, p.311, 1982. Appud. Davies & Law, 1984.
- HARGROVE, R.E.; McDONOUGH, F.E. & TITSLER, R.P. Phosphate heat treatment of milk to prevent bacteriophage proliferation in lactic streptococci. *Journal of Dairy Science* 44(10): 1789-1910, 1961.
- HARRINGAN, W.F. & MacCANCE, M.E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology.*, parte III Schemes for the identification of micro-organisms, p. 243-277, London, Academic Press, 1976.
- HEAP, H.A.; LIMSOVTIN, G.K.Y. & LAWRENCE, R.C. Contribution of *Streptococcus lactis* strains in raw milk to phage infection in commercial cheese factories. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology* 13(1): 16-22, 1978.
- HEAP, H.A. & JARVIS, A.W. Comparasion of prolate and isometric headed lactic streptococcal bacteriophages. *New Zealand Journal of Dairy Science Techonology* 15(1): 75-81, 1980.
- HEAP, H.A. & LAWRENCE, R.C. The selection of starter for cheesemaking. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology* 11(1): 16-20, 1976.

- HENNING, D.R.; BLACK, C.H.; SANDINE, W.E. & ELLIKER, P.R.
Host-range studies of lactic streptococcal bacteriophages.
Journal of Dairy Science 51(1): 16-21, 1968.
- HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. The use of transmission electron microscopy to study the composition of *Pseudomonas fragi* attachment material. *Food Microstructure* 7(1): 53-57, 1988.
- d'HERELE, F. Elimination du bacteriophage dans les symbiosis bacterie-bacteriophage. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 104: 1254. 1930 apud ADAMS, M.H., 1959.
- HILL, C.; MILLER, L.A. & KLAENHAMMER, T.R. The bacteriophage resistant plasmid pTR2030 forms high-molecular-weight multimers in lactococci. *Plasmid* 25(2): 105-112, 1991.
- HUGGINS, A.R. & SANDINE, W.E. Incidence and proprieties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Applied Enviromental Microbiology* 33(1): 184-191, 1977.
- HUGENHOLTZ, J. Proprieties dynamics of mixed starter cultures. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 40(2/3): 129-140, 1986.
- HUGHES, B.F. & MCKAY, L.L. Deriving phage-insensitive Lactococci using a food-grade vectors encoding phage and nisin resistance *Journal of Dairy Science* 75(4): 914-923, 1992.
- HULL, D.R.(a) Control of bacteriophage in cheese factories. *Australian Journal of Dairy Techonology* 32(2): 65-66, 1977.
- HULL, D.R.(b) Methods for monitoring bacteriophage in cheese factories. *Australian Journal of Dairy Technology* 32(2): 63-64, 1977.
- HULL, R.R. & BROOKE, A.R. Bacteriophage more active against cheddar cheese starter in unheated milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 37(4): 143-146, 1982.
- HUNGER, W. Bacteriophages in the milk fermenting industry. *Danish Dairy Industry...Worldwide* 5: 18-24, 1986.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz. Vol.I. Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos 2a.ed. IAL-SP, 1976, 371p.
- INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36:354-356, 1986.

- JARVIS, A.W. The serological differentiation of lactic streptococcal bacteriophage. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology* 12(3): 176-181, 1977.
- JARVIS, A.W. The use of whey-derived phage-resistant starter strains in New Zealand cheese plants. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 16(1): 25-31, 1981.
- JARVIS, A.W. (a) Differentiation of lactic streptococcal bacteriophage into bacteriophage specificity by DNA-DNA homology. *Applied Environmental Microbiology* 47(2): 343-349, 1984.
- JARVIS, A.W. (b) DNA-DNA homology between lactic streptococci and their temperate and lytic phages. *Applied Environmental Microbiology* 47(5): 1031-1038, 1984.
- JARVIS, A.W. Conjugal transfer in lactic streptococci of plasmid encoded insensitivity to prolate-headed and small isometric head bacteriophage. *Applied Environmental Microbiology* 54(3): 771-783, 1988.
- JARVIS, A.W. Bacteriophage of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 72(12): 3406-3428, 1989.
- JARVIS, A.W. & MEYER, J. Electron microscopy heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analyses of the Dna genomes of three lactic streptococcal bacteriophages. *Applied Environmental Microbiology* 51(3): 566-571, 1986.
- KAMAL, K.M. & MARTH, E.H. Proteinase and peptidase activities of cell free extracts from mutant strains of lactic streptococci. *Journal of Dairy Science* 71(9): 2349-2357, 1988.
- KEMPLER, G.M. & MCKAY, L.L. Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilizations. *Applied Environmental Microbiology* 37(2): 316-323, 1979.
- KEOGH, B.P. Adsorption, latent period and burst size of phages of some strains of lactic streptococci. *Journal of Dairy Research* 40(3): 303-309, 1973.
- KEOGH, B.P. The longevity of the bacteriophage of lactic streptococci. *Australian Journal of Dairy Technology* 38(1): 32-33, 1983.
- KEOGH, B. & SHIMMIN, P.D. Morphology of the bacteriophage of lactic streptococci. *Applied Microbiology* 27(2): 411-415, 1974.

- KIM, J.H. & BATT, C.A. Molecular characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophage F4-1. *Food Microbiology* 133(11): 15-26, 1991.
- KING, N.S. & KOBURGER, A. Characterization of some group N Streptococci. *Journal of Dairy Science* 53(1): 403-409, 1970.
- KING, W.R.; COLLINS, E.B. & BARRET, E.L. Frequences of bacteriophage resistant and slow acid producing variants of *Streptococcus cremoris*. *Applied Enviromental Microbiology* 45(5): 1481-1485, 1983.
- KLAENHAMMER, T.R. Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. *Advances in Applied Microbiology* 30: 1-29, 1984.
- KOZAK, W.; RAJCHERT-TRZPIL, M.; ZAJDEL, J. & DOBRZANSKY, W.T. Lysogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. *Applied Microbiology* 25(2): 305-308, 1973.
- KOSIKOWSKI, F. Cheese and Fermented Milk Foods. New York, Published by F. V. Kosikowski and Associations. 1978. 711p.
- KRIEL, J.B. & MOUTFORD, L.H. The effectiveness of certain commercial bacteriophage inhibition media. *South African Journal of Dairy Technology* 7(1): 117-121, 1975.
- KRIEL, J.B.; HOLZAPFEL, W.H. & MOUTFORD, L.A. A bacteriophage inhibition medium for cheese starter cultures. *South African Journal of Dairy Technology* 8(1): 45-49, 1976.
- KRIEL, J.B. & HOLZAPFEL, W.H. Factors influencing the activity of starter cultures in milk: I. Incubation at 15°C and 22°C. *South African Journal of Dairy Technology* 9(3): 97-100, 1977.
- LAWRENCE, R.C. & PEARCE, L.E. Cheese starters under control. *Dairy Industries* 37: 73-78, 1972.
- LAWRENCE, R.C. Action of bacteriophage on lactic acid bacteria: consequences and protection. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 13:129-136, 1978.
- LAWRENCE, R.C.; THOMAS, T.D. & TERZAGHI, B.E. Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *Journal of Dairy Research* 43(1): 141-193, 1976.
- LEMBKE, J & TEUBER, M. Serotyping of morphologically identical bacteriophage of lacti streptococci by immunoelectron microscope *Milchwissenschaft* 36: 10-12, 1981.

- LIMSOWTIN, G.K.Y. & TERZAGHI, B.E. Phage resistance mutants: their selection and use in cheese factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 11(4): 251-256, 1976.
- LIMSOWTIN, G.K.Y.; HEAP, H.A. & LAWRENCE, R.C. A multiple starter concept for cheesemaking. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology* 12(2): 101-106, 1977.
- LIMSOWTIN, G.K.Y.; HEAP, H.A. & LAWRENCE, R.C. Heterogeneity among strains of lactic streptococci. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 13(1): 1-8, 1978.
- LOWRIE, R.J. Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Applied Microbiology* 27(1): 210-217, 1974.
- LUNDSTEDT, E. Some reflections of development of starter for the cultured dairy products industry. *Cultured Dairy Products Journal* 18(1): 10-15, 1983.
- MARSHALL, R.J. & BERRIDGE, N.J. Selection and some proprieties of bacteriophage resistant-starters for cheese makey. *Journal of Dairy Research* 43(3): 449-458, 1976.
- McKAY, L.L. & BALDWIN, K.A. Induction of *Streptococcus lactis* Cz by ultraviolet irradiation. *Applied Microbiology* 25(4): 682-684, 1973.
- McKAY, L.L. Functional proprieties of plasmid en lactic streptococci *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3): 259-274, 1983.
- MEISTER, K.A. & REDFORD, R.A. Optimum cultural conditions for induction of temperate bacteriophages en lactic streptococci. *Journal of Food Protection* 42(5): 396-400, 1979.
- MOELLER, V. & TEUBER, M. Selection and characterization of phage - resistant mesophilic lactococci from mixed-strain dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* 43(8): 482-486, 1988.
- MOYNET, Structure of 8 streptococcal bacteriophages. *Virology* 142(2): 263-269, 1985.
- MULLAN, M.A.; DALY, C. & FOX, P.F. Effect of cheese-making temperatures on the interactions of lactic streptococci and their phages. *Journal of Dairy Research* 48(3): 465-471, 1981.
- MUNDT, O. Genus *Streptococcus*. In. SMEATH, P.H.A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, 9th ed, Baltimore, Williams and Walkins, Baltimore, 1988.

- NEVE, H. & TEUBER, M. Base microbiology and molecular biology of bacteriophage of lactic acid bacteria dairies. *Bulletin of International Dairy Federation* 263: 3-15, 1991.
- NICHOLS, A.A. & HOYLE, M. Bacteriophage in typing lactic streptococci. *Journal of Dairy Research* 16: 169-208, 1949.
- NUNEZ, M.; CHAVARI, F.J.; GARCIA, B.E. & GAYTAN, L.F. The effect of lactic starters inoculation and storage temperature on the behaviour of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* in Burgos cheese. *Food Microbiology* 3(3): 235-242, 1986.
- OLIVEIRA, J.S. Controle de qualidade. In. *Queijos: Fundamentos Tecnológicos*, Campinas, Ed. da UNICAMP, São Paulo. Cap. 5. 85-104, 1986.
- ORAM, J.D. Isolation and proprients of a bacteriophage receptor substance from the plasma membrane of *Streptococcus lactis* M13. *Journal of General Virology* 13: 59-71, 1971.
- OVERCAST, W.W.; NELSON, F.E. & PARMELEE, C.E. The influence of pH on proliferation of the lactic streptococcus bacteriophage. *Journal of Dairy Science* 33(6): 403, 1950.
- PEARCE, L.E. The effect of host-controlled modification on the replication rate of a lactic streptococcal bacteriophage. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology* 13(3): 166-171, 1978.
- PETTERSON, H.E. Mesophilic starters. *Bulletin of International Dairy Federation* 227: 19-26, 1988.
- POTTER, N.N. Host-induced changes in lactic streptococcal bacteriophages. *Journal of Dairy Science* 53(10): 1358-1362, 1970.
- REDDY, M.S.; VEDAMUTHU, E.R.; WASHAM, C.J. & REINBOLD, G.W. Associative growth studies in three-strain mixtures of lactic streptococci. *Applied Microbiology* 24(6): 953-957, 1972.
- REDDY, K.P. & RICHARDSON, G.H. Lactic bulk culture system utilizing whey based bacteriophage inhibitory medium and pH control: IV. Applicability to Italian and Swiss cheese cultures. *Journal of Dairy Science* 60(10): 1527-1531, 1977.
- REITER, B. Lysogenic strains of lactic streptococci. *Nature* 164: 667-668, 1949.
- REITER, B. & KIRIKOVA, M. The isolation of a lysogenic strain from a multiple strain starter culture. *Journal of Society Dairy Technology* 29(4): 221-225, 1976.

- RELANO, P.; MATA, M.; BONNEAU, M. & RITZENTHALER, P. Molecular characterization and comparison of 38 virulent and temperate bacteriophages of *Streptococcus lactis*. *Journal of General Microbiology* 133: 3053-3064, 1987.
- REYROLLE, J.; CHOPIN, M.C.; LETELLIER, F. & NOVEL, G. Lysogenic strain of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Applied Environmental Microbiology* 43(2): 349-356, 1982.
- RICHARDSON, G.H.; CHENG, C.T. & YOUNG, R. Lactic bulk culture system utilizing a whey based bacteriophage medium and pH control: I. Applicability to american style cheese. *Journal of Dairy Science* 60(3): 378-386, 1977.
- RICHARDSON, G.H.; HONG, G.L. & ERNSTROM, C.A. Defined single strain of lactic streptococci in bulk culture for cheddar and Monterey cheese manufacture. *Journal of Dairy Science* 63(12): 1981-1986, 1980.
- RICHARDSON, G.H.; ERNSTROM, C.A. & DALY, C. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starter. *Journal of Dairy Science* 66: 2278-2286, 1983.
- SANDERS, M.E. & KLAENHAMMER, T.R. Phage resistance in a Phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: Temperature-dependent bacteriophage development and host-controlled phage replication. *Applied Environmental Microbiology* 47(5): 979-985, 1984.
- SANDERS, M.E.; LEONHARD, D.J.; SING, W.D. & KLAENHAMMER, T.R. Conjugal strategy for construction of fast-acid producing bacteriophage-resistance lactic streptococci for use in dairy fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 52(5): 1001-1007, 1986.
- SANDERS, M.E.; LEONHARD, D.J.; SING, W.D. & KLAENHAMMER, T.R. Conjugal strategy for construction of fast-acid producing, bacteriophage-resistance lactic streptococci for use in dairy fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 52(5): 1001-1007, 1986.
- SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R.; HEAP, H.A. Bacteriophage-lyses of *Streptococcus diacetylactis* and its effect on biacetyl production in mixed-strain starter culture. *Journal of Dairy Science* 43(6): 755-761, 1960.
- SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R. & HAYS, H. Cultural studies on Streptococcal group. *Canadian Journal of Microbiology* 8:161-174, 1962.

- SANDINE, W.E. New techniques in handling lactic cultures to enhance their performance. *Journal of Dairy Science* 60(5): 822-827, 1977.
- SANDINE, W.E. The streptococci: milk products. in GILLILAND, S.E. *Bacterial starter cultures for foods*. CRC Press Inc., New York. cap.2, p.5-24, 1985.
- SANDINE, W.E. New nomenclature of the nonrod-shaped lactic acid bacteria. *Biochemie* 70: 519-522, 1988.
- SANTOS, A.L.L.; AZEVEDO, J.L. & CHOPIN, M.C. Estreptococos lácticos e seus bacteriófagos. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 23(1): 17-59, jan/mar, 1986
- SAXELIN, M.L.; NURMIAHOLASSILA, E.L.; MERILAINEN, V. & FORSEN, R. I. Ultrastructure and host especificity of bacteriophage of *Streptococcus cremoris*, *Ctreplococcus lactis* ssp *diacetylactis* and *Leuconostoc cremoris* from finnish fermented milk "villi". *Applied Enviromental Microbiology* 52(4): 771-777, 1986.
- SIJTSMAL, L. et alii. Cell surface characteristics of bacteriophage resistant *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* SK10 and its bacteriophage sensitive variants SK12. *Applied Enviromental Microbiology* 56(10): 3230-3233, 1990.
- SINHA, R.P. Alteration of host-specificity to lytic bacteriophage in *Streptococcus cremoris*. *Applied Environmental Microbiology* 40(2):326-332, 1980.
- SHARPE, M.E. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *Journal of Society Dairy Technology* 32(1): 9-18, 1979.
- SHIEH, C.Y.S.; LEDFORD, R.A., DUNNY, G.M. & LIBOFF, M. Ultrastructure and lytic activity of bacteriophages isolates from cheese wheys. *Journal of Dairy Science* 75(6): 1394-1401, 1992.
- SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. Willians and Walkins, Baltimore, USA.
- SOZZI, T. Etude sur l'exigence in calcium des phages des ferments lactiques. *Milchwissenschaft* 27: 503, 1972.
- SPECK, N.L. & GILLILAND, S.E. Concentrated starters and the manufacture of buttermilk. *Cult. Dairy Products Journal* 10: 10,1975.
- SPELLMANN, H. & BANHEGYI, M. Response of a mixed culture of lactic acid bacteria to phage contamination. *Chemie Microbiologie Technologie der Lebensmittels* 9(5/6): 184-189, 1986.

- STANIER, R.Y.; INGRAHAM J.L.; WHEELIS, M.L. & PAINTER, P.R. Gram-Positive fermentative eubacteria. In. *The Microbial World*, Prentice-Hall, New Jersey, cap. 23, p.495-504, 1986.
- STANLEY, G. The manufacture of starter by batch fermentation and centrifugation to produce concentrates. *Journal Society Dairy Technology* 30: 36, 1977.
- STADHOUDERS, J. Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* 29: 329-337, 1974.
- STADHOUDERS, J. Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Netherlands milk Dairy Journal* 29: 104-126, 1975.
- STADHOUDERS, J. & LEENDERS, G.J.M. Spontaneously developed mixed-strain cheese starters. Their behaviour towards phages and their use in the Dutch cheese industry. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 38(3): 157-181, 1984.
- SWARTLING, P.F. Biochemical and serological proprieties of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *Journal of Dairy Research* 18: 256-267, 1951.
- TERZAGHI, B.E & SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29(6): 807-813, 1975.
- TERZAGHI, B.E. Morphologies and host sensitivities of lactic streptococcal bacteriophage from cheese factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 11(3): 155-163, 1976.
- TEUBER, M & LEMBKE, J. The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3): 283-295, 1983.
- TESFAIGZI, J. & SUSSMUTH, R. Proportion of phage-insensitive and phage-sensitive cells within pure strain of lactic streptococci and the influence of calcium. *Journal of Dairy Research* 56(1): 151-154, 1989.
- THUNELL, R.K. & SANDINE, W.E. Phage insensitive, multiple strain starter approach to cheddar cheese making. *Journal of Dairy Science* 64(11): 2270-2277, 1981.
- THUNELL, R.K. & SANDINE, W.E. Types of starter cultures. In. *Bacterial starter cultures for foods*, GILLILAND, S.E., CRC Press Inc., New York, cap. 10, p.127-144, 1985.
- TWORT, F.W. An investigation on the nature of ultramicroscopia virus. *Lancet* 2:1241. 1915. Apud. Adams, M.H., 1959.

- VALYASEVI, R.; GELLER, B.L. & SANDINE, W.E. Characterization of bacteriophages receptor sites for lactococci. *Journal of Dairy Science* 72 (supl.1): 145, 1989.
- VLEGELS, P.A.P. & WOUTERS, J.T.M. Bacteriophage resistance of *Streptococcus cremoris*. *Antonie van Leeuwenhoek* 51(5/6): 557, 1985.
- WATKINS, S.H.; HAYS, H. & ELLIKER, P.R. Virucidal activity of hipoclorite, quaternary ammonium compounds and iodophors against bacteriophage of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Milk and Food Technology* 20(3): 84-87, 1957.
- WHITEHEAD, H.R. & COX, G.A. The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci. *New Zealand Journal Science Technology* 16(5): 319-320, 1935, apud BABEL, F.J., 1946.
- WHITEHEAD, H.R. Bacteriophage in cheese manufacture. *Bacteriology Review* 17: 109-123, 1953.
- YANG, N.L. & SANDINE, W.E. Acid-producing activity of lyophilized lactic streptococcal cheese starter concentrates. *Journal of Dairy Science* 62(6): 908-915, 1979.
- ZEHREN, V.L. & WHITEHEAD, H. Growth characteristics of streptococcal bacteriophage in relation to cheese manufacture. *Journal of Dairy Science* 37(2): 209-219, 1954.
- ZOTTOLA, E.A. & MARTH, E.H. (a) Thermal inactivation of bacteriophage active against lactic streptococci. *Journal of Dairy Science* 49 (11):1338-1342, 1966.
- ZOTTOLA, E.A. & MARTH, E.H. (b) Dry-blended phosphate treated milk media for inhibition of bacteriophage active against lactic streptococci.. *Journal of Dairy Science* 49(11): 1343-1349, 1966.