



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR

**MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES DO LEITE:
ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DE BACTÉRIAS
PSICROTRÓFICAS E TERMODÚRICAS MESÓFILAS**

Londrina
2017

JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR

**MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES DO LEITE:
ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DE BACTÉRIAS
PSICROTRÓFICAS E TERMODÚRICAS MESÓFILAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R484m Ribeiro Júnior, José Carlos.

Micro-organismos deteriorantes do leite : \$b atividade proteolítica e lipolítica de bactérias psicrotólicas e termofílicas mesófilas / José Carlos Ribeiro Júnior. – Londrina, 2017.

113 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Leite – Microbiologia.– Teses. 2. Enzimas microbianas.– Teses. 3. Leite – Pasteurização. – Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU 637.1:579

JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR

**MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES DO LEITE:
ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DE BACTÉRIAS
PSICROTRÓFICAS E TERMODÚRICAS MESÓFILAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dra. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Evelise Oliveira Telles
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof^a. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos mestres, Professores que mesmo diante de todas as dificuldades, falta de reconhecimento e valorização, muitas vezes desgastados pela falta de condições mínimas de desenvolvimento de seu trabalho, me trouxeram o conhecimento e a formação, que não só me permitiram chegar ao Doutorado, como também me entusiasmaram a sempre permanecer na busca do conhecimento.

Em especial à minha orientadora, Professora Doutora Vanerli Beloti, ou simplesmente Neli, a quem tanto se dedica à formação de “suas crianças”. Neli, agradeço por toda paciência, por responder minhas mensagens durante a noite quando aparecia aquela dúvida, por toda atenção e responsabilidade dedicada, por todos os artigos que a senhora corrigiu durante suas férias (eu sempre preparava material de leitura para as suas viagens) e por todos os bons exemplos. Agradeço em separado por toda a sua compreensão nos momentos mais difíceis da minha vida, quando não pude dedicar aos estudos todo o tempo que eu gostaria, quando a responsabilidade de cuidar de uma família veio antes de me preparar para o futuro.

Agradeço também à banca examinadora de qualificação e defesa desse trabalho, pela disponibilidade e atenção dispensadas. Em especial ao Prof. Dr. André L. Martinez de Oliveira por toda a colaboração durante o desenvolvimento experimental.

Aos amigos do LIPOA, todos os estagiários, residentes e pós-graduandos que passaram pelo “Leite” ao longo desses 9 anos da minha estadia. Em especial ao Ronaldo Tamanini, por todo suporte às pesquisas e pela confiança depositada no meu trabalho em biologia molecular, desde a estruturação do Laboratório até o treinamento das novas gerações.

À minha família, minhas irmãs e meus pais. Meu pai, José Carlos Ribeiro, teve de largar muito cedo os estudos para se dedicar à agricultura familiar, porque como ele mesmo me disse: “Larguei a escola porque eu não aguentava ver as costas de sal (suor) nas costas do meu pai”. Muito humilde e conhecido como “o homem mais trabalhador de Bela Vista do Paraíso” sempre colocou a formação dos filhos em primeiro lugar. Recentemente ele nos deixou. Seus bons exemplos não. Obrigado, Pai, por tudo. Essa tese de doutorado é dedicada à você!

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos. **Micro-organismos deteriorantes do leite: atividade proteolítica e lipolítica de bactérias psicrotróficas e termodúricas mesófilas**. 2017. 111 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A presença de enzimas microbianas deteriorantes termoestáveis proteolíticas e lipolíticas pode comprometer a qualidade e vida útil do leite processado e derivados, mesmo que o leite cru apresente baixas contagens totais de micro-organismos. Além disso, as formas microbianas vegetativas ou esporuladas podem resistir à pasteurização e também atuarem como deteriorantes do leite pasteurizado. Como passo preliminar para redução dos micro-organismos deteriorantes no leite cru refrigerado, aumento da vida útil e do potencial tecnológico do leite pasteurizado, o presente trabalho teve como objetivo identificar a diversidade genética de micro-organismos psicrotróficos e termodúricos com potencial deteriorante proteolítico e/ou lipolítico no leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica. Foram avaliadas 20 amostras de leite cru refrigerado produzido na bacia leiteira da região de Castro, Paraná, nas quais foram utilizados métodos oficiais para a contagem e isolamento de psicrotróficos e termodúricos e técnicas biomoleculares de agrupamento genético hierárquico (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e caracterização (sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise filogenética) dos isolados. As contagens médias de psicrotróficos e termodúricos foram $1,1 \times 10^4$ e $3,2 \times 10^2$ UFC/mL, respectivamente. Entre os psicrotróficos, 47,8% do total de isolados ($n = 295$) apresentaram atividade deteriorante, dos quais 30,5% foram proteolíticos e lipolíticos simultaneamente, 31,9% exclusivamente proteolíticos e 37,6% lipolíticos. Pelos dendrogramas foram determinados 36 *clusters* de psicrotróficos proteolíticos e 47 de lipolíticos com 70% de similaridade hierárquica, cuja identificação filogenética determinou o predomínio das espécies com os mesmos perfis polimórficos de *Lactococcus lactis* (24,5%), *Enterobacter kobei* (15,4%), *Aerococcus urinaeequi* (8,4%) e *Acinetobacter lwoffii* (6,3%) entre os psicrotróficos deteriorantes. *Serratia ureilytica*, *Enterobacter kobei*, *Pseudomonas* spp. e *Yersinia enterocolitica* foram os psicrotróficos identificados como potencialmente produtores de metaloprotease alcalina (*aprX*). Entre os termodúricos, 42,6% do total de isolados ($n = 310$) foram deteriorantes, dos quais 32,6% apresentaram atividade proteolítica e lipolítica simultaneamente, 31% exclusivamente proteolítica e 36,4% apenas lipolítica. Esses isolados proteolíticos e lipolíticos foram agrupados em 41 e 38 *clusters*, respectivamente, considerando 50% de similaridade. A análise filogenética das sequências parciais do gene 16S rRNA revelou que predominam entre os termodúricos deteriorantes as espécies *Bacillus licheniformis* (34,1%), *Brachybacterium nesterenkovi* (14,4%), *Enterococcus faecalis* (9,1%) e *Streptococcus agalactiae* (8,3%). Foi observado que 50% das cepas de termodúricos pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, frequentemente descritos como esporulados que resistem a tratamentos térmicos mais intensos que a pasteurização e que comprometem a vida útil do leite pasteurizado dos Estados Unidos. Os resultados do presente trabalho demonstram que a composição da microbiota é tão importante quanto a sua quantificação. Apesar de baixas contagens, psicrotróficos e termodúricos podem comprometer a qualidade do leite e derivados pela sua atividade deteriorante, sendo um fator limitante na manutenção da qualidade do leite fluido e derivados. Portanto, é necessário desenvolver ferramentas sensíveis e eficientes para monitorar e controlar a presença desses micro-organismos no leite cru.

Palavras-chave: Diversidade microbiana. Lipólise. Microbiologia do Leite. Pasteurização. Proteólise.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos. **Milk spoilage microorganisms: proteolytic and lipolytic activity of psychrotrophic and mesophilic thermophilic bacteria**. 2017. 111 p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The presence of heat-stable spoilage enzymes can compromise the milk and dairy products quality and shelf life, even if raw milk with low total microorganisms counts. In addition, the vegetative or sporulated microbial forms may resist pasteurization and also deteriorate pasteurized milk. The present work aimed to identify the genetic diversity of psychrotrophic and thermophilic microorganisms with proteolytic and/or lipolytic potential in high microbiological quality refrigerated raw milk. Twenty samples of refrigerated raw milk produced in the dairy region of Castro, Paraná State, Brazil, were evaluated per official methods for the counting and isolation of psychrotrophic and thermophilic. Biomolecular techniques of hierarchical genetic grouping (Restriction Fragment Length Polymorphism) and identification by partial sequencing of the 16S rRNA gene and phylogenetic analysis. The mean of psychrotrophic and thermophilic counts were 1.1×10^4 and 3.2×10^2 CFU/mL, respectively. Among the psychrotrophs, 47.8% of the total isolates (n = 295) presented spoilage potential, of which 30.5% were proteolytic and lipolytic simultaneously, 31.9% exclusively proteolytic and 37.6% lipolytic. The dendrograms determined 36 clusters of proteolytic and 47 lipolytic psychrotrophs with 70% genetic hierarchical similarity, whose phylogenetic identification shows the predominance of the species with the same polymorphic profiles of *Lactococcus lactis* (24.5%), *Enterobacter kobei* (15.4%), *Aerococcus urinaeaequi* (8.4%) and *Acinetobacter lwoffii* (6.3%) among the deteriorating psychrotrophs. *Serratia ureilytica*, *Enterobacter kobei*, *Pseudomonas* spp. and *Yersinia enterocolitica* were the psychrotrophs identified as potentially producing of alkaline metalloprotease (*aprX* gene positive). Among the thermophilic, 42.6% of the total isolates (n = 310) shows spoilage potential, of which 32.6% presented proteolytic and lipolytic activity simultaneously, 31% were exclusively proteolytic and 36.4% only lipolytic. These proteolytic and lipolytic isolates were grouped in 41 and 38 clusters, respectively, considering 50% of genetic similarity. Phylogenetic analysis of partial sequences of 16S rRNA gene revealed that *Bacillus licheniformis* (34.1%), *Brachybacterium nesterenkovi* (14.4%), *Enterococcus faecalis* (9.1%) and *Streptococcus agalactiae* (8.3%). It was observed that 50% of the thermophilic strains belong to the genus *Bacillus* and *Paenibacillus*, often described as sporulated that resist heat treatments that are more intense at pasteurization and that compromise the shelf life of the pasteurized milk in the United States. The results of the present study demonstrate that the microbiota composition of raw milk as so important that your quantification. Although low counts, psychrotrophic and thermophilic can compromise the milk quality and dairy products by their deteriorating activity, being a limiting factor for the maintenance of the quality. Therefore, it is necessary to development of a sensitive and efficient tools to monitor and control the presence of these microorganisms in raw milk.

Key words: Lipolysis. Microbial diversity. Milk Microbiology. Pasteurization. Proteolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESTADO DA ARTE

- Figura 1** – Produção de leite cru refrigerado no Brasil entre 1990 e 2015 14
- Figura 2** – *Ranking* dos principais países produtores de leite no ano de 2015 em bilhões de toneladas métricas 15
- Figura 3** – Distribuição e percentual das atividades proteolíticas e/ou lipolíticas de cepas mesofílicas isoladas de leite cru refrigerado da região de Castro-PR. 29

ARTIGO A

- Figure 1** – A phylogenetic similarity dendrogram of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from Brazilian raw milk, using the variables of the amplification profile of the Internal Transcript Spacer region 16-23S (ITS profile) and its restriction profile with the enzyme Cfo I, Dice coefficient and the unweighted pair group mean averages algorithm (UPGMA). The vertical line represents the minimum percentage of similarity (70%) used to determine the 36 clusters.. 71
- Figure 2** – A phylogenetic similarity dendrogram of lipolytic psychrotrophic bacteria isolated from Brazilian raw milk prepared using the variables of the amplification profile of the Internal Transcript Spacer region 16-23S (ITS profile) and its restriction profile with the enzyme Cfo I, Dice coefficient and the unweighted pair group mean averages algorithm (UPGMA). The vertical line represents the minimum percentage of similarity (70%) used to determine the 47 clusters. 72

ARTIGO B

- Figura 1** – Dendrograma de similaridade filogenética de bactérias termodúricas proteolíticas isoladas do leite cru brasileiro, elaborado utilizando-se RFLP do gene 16S rRNA com as enzimas CfoI, TaqI, HaeIII e RsaI, coeficiente de Dice e algoritmo *Unweighted Pair Group Mean Averages* (UPGMA). A linha vertical representa o percentual mínimo de similaridade (50%) utilizado para determinação dos 41 *clusters* 80
- Figura 2** – Dendrograma de similaridade filogenética de bactérias termodúricas lipolíticas isoladas do leite cru brasileiro, elaborado utilizando-se RFLP

do gene 16S rRNA com as enzimas CfoI, TaqI, HaeIII e RsaI, coeficiente de Dice e algoritmo *Unweighted Pair Group Mean Averages* (UPGMA). A linha vertical representa o percentual mínimo de similaridade (50%) utilizado para determinação dos 38 *clusters* 81

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

Table 1 - Primers and PCR cycling conditions..... 70

Table 2 – Identification of spoilage microorganisms (n=141) among the total psychrotrophic microbiota (n=295) with proteolytic and lipolytic potential at 35°C and 7°C of the strains from high microbiological quality Brazilian refrigerated raw milk. 73

ARTIGO B

Tabela 1 – Bactérias termodúricas isoladas do leite cru refrigerado brasileiro de alta qualidade microbiológica, identificação, proporcionalidade e potencial deteriorante 82

LISTA DE QUADROS

ESTADO DA ARTE

- Quadro 1** – Valores médios da Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e constituintes físico-químicos do leite cru refrigerado produzido por pequenos (49) e grandes (20) produtores do estado do Paraná 18
- Quadro 2** – Distribuição da Contagem Bacteriana Total (CBT) do leite cru refrigerado produzido por pequenos e grandes produtores do estado do Paraná, Brasil 18
- Quadro 3** Micro-organismos esporulados termodúricos e/ou termofílicos isolados do leite em diversos países..... 24
- Quadro 4** – Micro-organismos proteolíticos de amostras de leite cru refrigerado oriundas de pequenos e grandes produtores do estado do Paraná (PR) e de pequenos produtores do estado do Maranhão (MA) no período de novembro de 2013 a novembro de 2014..... 26
- Quadro 5** – Micro-organismos lipolíticos de amostras de leite cru refrigerado oriundas de pequenos e grandes produtores do estado do Paraná (PR) e de pequenos produtores do estado do Maranhão (MA) no período de novembro de 2013 a novembro de 2014..... 26
- Quadro 6** – Identificação genética das cepas mesofílicas com capacidade deteriorante isoladas do leite cru refrigerado de propriedades centro-orientais do Paraná, no período de novembro de 2013 a maio de 2014. 28
- Quadro 7** – Cepas de bactérias mesófilas proteolíticas e/ou lipolíticas identificadas por sequenciamento genético isoladas do leite cru de três regiões do estado do Maranhão entre setembro e outubro de 2014. 30
- Quadro 8** – Identificação molecular e perfil de identidade das bactérias psicrotróficas deteriorantes isoladas do leite cru coletado de propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014..... 31
- Quadro 9** – Potencial deteriorante de cepas de bactérias oriundas da germinação de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado da bacia leiteira da região de Castro, Paraná..... 32

Quadro 10 – Identificação de cepas de bactérias deteriorantes formadoras de esporos isoladas de 10 amostras de leite cru de três regiões do estado do Maranhão entre setembro e outubro de 2014.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Hart Infusion</i>
BPHO	Boas Práticas de Higiene na Ordenha
CBT	Contagem Bacteriana Total
DNA	Ácido desoxido ribonucleico
H	Hora
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS	<i>Internal Transcript Spacer</i>
Mm	Mili-mol
Min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Mili-molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MM	Mega-molar
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCA	Plate Count Ágar
Pmol	Pico-mol
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Seg	Segundos
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Mean Averages</i>
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	ESTADO DA ARTE	14
2.1	PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL	14
2.2	QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU REFRIGERADO	15
2.3	DETERIORAÇÃO MICROBIANA DO LEITE	19
2.3.1	Sacarolíticos	20
2.3.2	Proteolíticos	20
2.3.3	Lipolíticos	22
2.4	INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DO LEITE NA VIDA ÚTIL DO LEITE	22
2.4.1	Micro-Organismos Termodúricos	23
2.5	AVANÇOS NA PESQUISA DA MICROBIOTA DETERIORANTE AUTÓCTONE DO LEITE CRU REFRIGERADO BRASILEIRO	25
2.5.1	Contagem de Proteolíticos e Lipolíticos	25
2.5.2	Aeróbios Mesófilos	26
2.5.3	Psicrotróficos	30
2.5.4	Termodúricos Psicrotróficos	31
2.5.5	Esporos Aeróbios	32
2.6	PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES E PERSPECTIVAS NA PESQUISA DESSES MICRO-ORGANISMOS	34
2.7	ESTRATÉGIAS PARA A MELHORIA DA QUALIDADE E AUMENTO DA VIDA ÚTIL DO LEITE PASTEURIZADO	35
	REFERÊNCIAS	36
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVO GERAL	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4	ARTIGO A – PRINCIPAIS DETERIORANTES PSICROTRÓFICOS EM LEITE CRU DE ALTA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA	49

5	ARTIGO B – DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES TERMODÚRICOS DO LEITE CRU REFRIGERADO DE ALTA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA	74
6	CONCLUSÃO.....	93
	APÊNDICE	94
	APÊNDICE A – SPOILAGE POTENTIAL OF <i>Pseudomonas</i> FROM GOAT AND BOVINE RAW MILKS	95

1 INTRODUÇÃO

O leite cru refrigerado que apresenta contagens elevadas de micro-organismos com atividade proteolítica e/ou lipolítica apresentará menor rendimento industrial para a produção de derivados, baixa vida útil do leite pasteurizado e problemas tecnológicos no leite tratado por *Ultra High Temperature* (UHT) (FAIRBAIRN; LAW, 1986; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; MATÉOS et al., 2015; CALDERA et al., 2016; STUKNYTĖ et al., 2016).

O controle da contaminação ambiental do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene durante a ordenha, o armazenamento e transporte, possibilita o atendimento do padrão de qualidade microbiológica previsto pela legislação (BRASIL, 2016) para o leite cru refrigerado (BELOTI et al., 2012; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2013). A refrigeração é considerada o principal processo que permite o armazenamento do leite cru nas propriedades rurais. É uma forma eficiente para controlar a multiplicação da microbiota mesófila que possui metabolismo prioritariamente sacarolítico (MURPHY et al., 2016) degradando a lactose e produzindo ácido láctico (BELOTI, 2015).

No entanto, parte da microbiota mesófila quando mantida sob refrigeração é capaz de alterar suas vias metabólicas, o que permite sua multiplicação sob baixas temperaturas, sendo denominados psicotróficos (SANTANA et al., 2001; MURPHY et al., 2016). Esses micro-organismos utilizam a proteólise e/ou lipólise para obtenção de energia, pela ação de proteases e lipases extracelulares e absorção dos produtos da lise enzimática (OLIVEIRA et al., 2015).

A pasteurização do leite cru é suficiente para eliminar os micro-organismos patogênicos ao consumidor, assim como eliminam grande parte das formas vegetativas dos psicotróficos (JAY, 2005). Por outro lado, as proteases e lipases produzidas por esses micro-organismos permanecem ativas e continuam a degradar os constituintes do leite, comprometendo a qualidade do produto para a produção de derivados e reduzindo a sua vida útil (SAMARZIJA et al., 2012; BAGLINIÈRE et al., 2017).

Mesmo o leite obtido de forma higiênica e com baixa Contagem Total de Bactérias (CBT) pode apresentar micro-organismos que resistem à pasteurização. Esses micro-organismos, denominados de termodúricos, podem continuar a se multiplicar no leite processado mantido sob refrigeração, degradando as proteínas e a gordura do leite (MURPHY et al., 2016) e comprometendo a vida útil do produto.

A partir do controle da contaminação ambiental do leite e, conseqüentemente, menor contagem de psicrotróficos, espera-se reduzir os problemas em decorrência das proteases e lipases microbianas termoestáveis, aumentando a vida útil do leite pasteurizado. Da mesma forma, é preciso controlar a contaminação por termodúricos e bactérias oriundas da germinação de esporos aeróbios, que são conhecidas por causarem redução da vida útil do leite pasteurizado no Estados Unidos (HUCK et al., 2007; RANEIRI et al., 2009, MILLER et al., 2015). No Brasil, pouco se sabe sobre a composição desses micro-organismos ou a origem da contaminação do leite cru por essa microbiota, o que dificulta o seu controle.

Portanto, mesmo no leite cru de baixa contaminação microbiana e, conseqüentemente, baixa CBT, pode haver a predominância de micro-organismos produtores de enzimas termoestáveis. Da mesma forma, micro-organismos deteriorantes resistentes ao processamento térmico, mesmo em populações reduzidas, podem comprometer a vida útil do leite pasteurizado e o seu potencial tecnológico nas indústrias (BELOTI, 2015).

Dessa forma, a alternativa para reduzir os problemas causados por psicrotróficos, termodúricos, esporulados e outras bactérias deteriorantes é evitar sua incorporação no leite cru. Boas Práticas de Higiene na Ordenha (BPHO) nem sempre são suficientes para controlar esses micro-organismos. Faz-se necessário, no primeiro momento, conhecer essa microbiota deteriorante no leite cru refrigerado nas condições brasileiras de produção. Assim, será possível determinar a origem da contaminação e estabelecer práticas específicas para controlar os micro-organismos deteriorantes no leite cru. Espera-se, então, menor incidência de problemas causados por bactérias deteriorantes, aumentando a vida útil do leite pasteurizado e a maior competitividade internacional das indústrias lácteas brasileiras.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

A produção brasileira de leite vem aumentando ao longo dos anos, conforme pode ser observado na Figura 1. Em 2015, dados preliminares do IBGE apontam que a produção nacional foi de 35 bilhões de litros, sendo inspecionados 24 bilhões (75%) desse total. Essa produção, em 2015, colocou o Brasil como quarto maior produtor mundial, ficando atrás somente da União Europeia, Estados Unidos e Índia (Figura 2).



Figura 1. Produção de leite cru refrigerado no Brasil entre 1990 e 2015. **Fonte:** IBGE (2015)

Em 2015, também de acordo com dados do IBGE (2015), a região sul do Brasil foi a maior produtora de leite do país, responsável por 12,32 bilhões de litros, o que representa 35,2% do total. Nesse mesmo ano, o estado do Paraná produziu 4,66 bilhões de litros, o que representa 37,8% do leite produzido na região sul e aproximadamente 13% da produção brasileira.

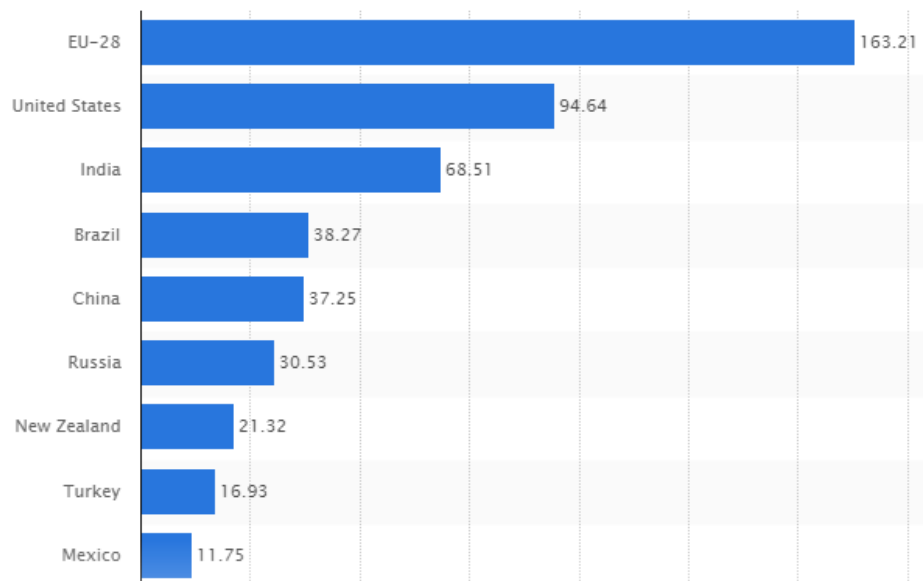


Figura 2. Ranking dos principais países produtores de leite no ano de 2015 em bilhões de toneladas métricas. **Fonte:** <https://www.statista.com/>. Acesso em: 10 de abril 2017.

2.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU REFRIGERADO

O aumento da produção de leite cru refrigerado (Figura 1) não foi acompanhado pelo aumento da sua qualidade. Pesquisas apontam a má qualidade microbiológica do leite cru refrigerado (BOZO et al., 2013; FRANÇA et al., 2015; NASCIMENTO NETA et al., 2016; FRANQUE et al., 2017), diretamente relacionada com o baixo potencial tecnológico do leite para a produção de derivados, curta vida útil do leite fluido pasteurizado e problemas tecnológicos no leite tratado por *Ultra High Temperature* (BELOTI, 2015).

A ordenha é o principal momento de contaminação microbiológica do leite (BELOTI, 2015), portanto, boas práticas de higiene durante a obtenção são fundamentais para garantir a qualidade do produto durante toda a cadeia de produção (BELOTI et al., 2012).

Diante do cenário de baixa qualidade microbiológica do leite cru brasileiro, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu a Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002), precursora da atual Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011), que determinam padrões de qualidade microbiológica do leite gradativamente mais rígidos, até que, em 2016, a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado brasileiro seria compatível com os padrões internacionalmente praticados de, até, 10^5 UFC/mL. Este parâmetro é determinado pela Contagem Bacteriana Total (CBT), que é indicativa da limpeza e sanitização dos sistemas de obtenção, armazenamento e transporte do leite (JAY, 2005). O

objetivo dessas legislações é, portanto, melhorar a qualidade do leite cru refrigerado brasileiro proporcionando maior potencial tecnológico e competitividade internacional.

No entanto, estudos apontam que a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado não vem melhorando no mesmo ritmo que previa a legislação (NERO et al., 2005; MATTOS et al., 2010; BOZO et al., 2013; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2013; SANDES et al., 2016). Fatores tradicionais de produção, a falta de incentivo à implantação de boas práticas de higiene na ordenha, ausência de programas de pagamento pela qualidade do leite cru refrigerado e baixo grau de investimento na atividade leiteira, são os principais entraves para redução da CBT do leite brasileiro (OHI et al., 2010; SILVA et al., 2011). Nesse sentido, em 2016, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº7 (BRASIL, 2016), que protelou o atendimento do padrão de até 10^5 UFC/mL para 2018 nas regiões sul, sudeste e centro-oeste e para 2019 nas regiões norte e nordeste.

Boa parte do leite cru refrigerado brasileiro ainda é produzido por pequenos produtores (IBGE, 2015). Essas propriedades, em geral, não apresentam investimento em tecnificação da produção de leite, atividade que muitas vezes é tida como secundária à produção de bezerras, subsistência com comercialização do excedente e produção de derivados informalmente comercializados, como por exemplo os queijos. Além disso, os pequenos produtores, em sua maioria, são desmotivados pelos baixos índices de produtividade e lucratividade do leite, principalmente em virtude da ordenha de animais de baixa produção e ausência de programação nutricional dos animais, ficando vulneráveis à sazonalidade climática no sistema extensivo.

Associado à produção tradicional dos pequenos produtores, também corroboram para o não atendimento dos padrões de qualidade determinados pela legislação a ausência de programas de pagamento por qualidade do leite por parte dos laticínios. O estudo de Roma Júnior et al. (2009) evidencia que propriedades inseridas em programas de incentivo financeiro pela melhor qualidade do leite apresentam diferenças significativas na CBT em relação à produtores que não recebem mais do laticínio pelo leite de melhor qualidade. Essa diferença também é igualmente significativa em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite (CASSOLI et al., 2013).

A execução de Boas Práticas de Higiene na Ordenha (BPHO) é o fator determinante para a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado, cuja implantação poderia vir a ser incentivada pelo pagamento por qualidade pelas indústrias, uma vez que o leite de baixa CBT proporciona maior rendimento industrial na produção de derivados, menor frequência de problemas tecnológicos e leite fluido de maior vida útil, favorecendo processos

logísticos (BELOTI, 2015). Diversos estudos relataram diferenças significativas na CBT do leite antes e depois da incorporação de BPHO (VALLIN et al., 2009; MATSUBARA et al., 2011; BELOTI et al., 2012). Ribeiro Júnior et al. (2014) demonstraram que a CBT pode ser reduzida em 95,26% após a implantação de BPHO e que práticas simples e de baixo custo são suficientes para a produção de leite cru refrigerado de acordo com o padrão de qualidade internacional ($< 10^5$ UFC/mL), última etapa da progressão estabelecida pela legislação (BRASIL, 2016).

Diferenças de qualidade são ainda mais evidentes quando se compara o leite produzido por pequenos e grandes produtores. As grandes propriedades leiteiras realizam a produção intensiva, com animais selecionados por melhoramento genético para a produção de leite, elevados índices de produtividade, programa nutricional para todo o período produtivo, alto grau de tecnificação da produção e CBT inferior a 10^4 UFC/mL (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2015b). Essas diferenças de tecnificação das propriedades também foram ressaltadas pelo estudo de Taffarel et al. (2013), o qual verificou que sistemas de ordenha mecânica canalizada, com resfriador de leite a granel, proporcionam melhor qualidade microbiológica do leite em relação à ordenha manual ou mecanizada com balde ao pé e resfriamento em tanques de imersão.

A bacia leiteira de Castro, que compreende também os municípios de Arapoti e Carambeí, região central do estado do Paraná, é caracterizada por grandes produtores. Ribeiro Júnior et al. (2015b) evidenciaram que essas propriedades leiteiras se dedicam exclusivamente à bovinocultura leiteira, com ordenha mecânica canalizada e, até mesmo, robotizada, presença de tanque de expansão nas propriedades, algumas com pré-resfriador em placa e médias de produção diária de 15.000 litros, com 450 bovinos da raça Holandesa ou Jersey puros registrados e 200 animais em lactação. BPHO eram rotina em todas as 20 grandes propriedades leiteiras estudadas.

Comparando a CBT dos produtores da bacia leiteira de Castro com pequenos produtores também do estado do Paraná, foram observadas diferenças significativas entre as médias de $3,8 \times 10^6$ UFC/mL e $1,5 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente para pequenas e grandes propriedades (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2015b), conforme pode ser observado no Quadro 1. Variações nos constituintes físico-químicos do leite também foram observadas, proporcionais à produção dos animais. O mesmo estudo verificou ainda que 95% das amostras de leite dos grandes produtores da bacia leiteira de Castro já apresentam CBT menor que 10^5 UFC/mL, conforme pode ser verificado no Quadro 2.

Quadro 1. Valores médios da Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e constituintes físico-químicos do leite cru refrigerado produzido por pequenos (n= 49) e grandes (n= 20) produtores do estado do Paraná.

	Pequenos produtores		Grandes produtores	
	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
CBT (UFC/mL)	3,8 x 10 ⁶	7,2 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴
CCS (CS/mL)	2,2 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁵
Gordura (%)	4,08 ^a	1,02	3,47 ^b	0,50
Proteína (%)	3,60 ^a	0,58	3,16 ^b	0,19
Lactose (%)	4,46 ^a	0,28	4,54 ^b	0,13
Sólidos Totais (%)	13,07 ^a	1,30	12,16 ^b	0,64

Fonte: Ribeiro Júnior et al. (2015b)

Quadro 2. Distribuição da Contagem Bacteriana Total (CBT) do leite cru refrigerado produzido por pequenos e grandes produtores do estado do Paraná, Brasil.

	<i>Intervalo (x 10³/mL)</i>	<i>Pequenos</i>		<i>Grandes</i>	
		<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
CBT	1 100	13	26,53	20	95,24
	100 200	4	8,16	1	4,76
	200 400	3	6,12	0	0
	400 600	5	10,20	0	0
	600 800	1	2,05	0	0
	800 1000	4	8,16	0	0
	> 1000	19	38,78	0	0

Fonte: Ribeiro Júnior et al. (2015b)

A metodologia para realização da CBT do leite em placas estabelece que nessa contagem são considerados todos os micro-organismos capazes de se multiplicar em 48 horas de incubação a 36±1°C em aerobiose (APHA, 1992). São, portanto, micro-organismos aeróbios mesófilos, com metabolismo sacarolítico, prioritariamente (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008). No entanto, parte dos micro-organismos mesófilos, quando submetidos a temperaturas de refrigeração, podem alterar suas vias metabólicas passando a utilizar as proteínas ou gordura do leite para sua multiplicação nessa condição térmica de armazenamento. Esses micro-organismos são denominados psicotróficos (SANTANA et al., 2001). Conforme Bramley e McKinnon (1990), psicotróficos variam entre 10% e 50% da microbiota total inicial do leite cru. Thomas e Thomas (1973), consideram que o leite

produzido em condições sanitárias inadequadas pode apresentar micro-organismos psicotróficos compondo mais que 75% da microbiota total.

Sob condições de baixa temperatura, alguns micro-organismos Gram negativos (ex. *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp.) e Gram positivos (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp.) quando presentes no leite, sintetizam fosfolípidos e lípidos neutros contendo proporções aumentadas de ácidos graxos insaturados, resultando em redução do seu ponto de fusão. Essa alteração permite a estes micro-organismos manter a fluidez da membrana celular sob baixa temperatura e, portanto, a sua funcionalidade contínua, transporte de solutos e secreção de enzimas extracelulares (BEALES, 2004; JAY, 2005; OLIVEIRA et al., 2015; XIN et al., 2017).

Tanto os aeróbios mesófilos quanto os psicotróficos utilizam-se dos constituintes do leite para a sua multiplicação, provocando a sua deterioração. Sob condições de refrigeração, o metabolismo de proteínas e gordura é favorecido pela menor energia de ativação de proteases e lipases em relação a lactase (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; OLIVEIRA et al., 2015). Os resíduos do metabolismo microbiano no leite também podem causar alterações organolépticas, comprometimento do rendimento nas indústrias e agravam a incidência de problemas tecnológicos nos derivados ou no leite UHT (CHEN et al., 2003; DUNSTALL et al., 2005; BARBANO et al., 2006; LIU et al., 2007; DE JONGHE et al., 2011; BELOTI, 2015).

Quanto ao aspecto legal de qualidade do leite, a legislação brasileira (BRASIL, 2011) não estabelece o limite para a contagem de micro-organismos psicotróficos no leite cru. No entanto, sabe-se que a contagem de psicotróficos superior à 10^6 UFC/mL é suficiente para o aparecimento de problemas sensoriais e tecnológicos como a geleificação e sedimentação de proteínas no leite UHT (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

2.3 DETERIORAÇÃO MICROBIANA DO LEITE

Por ser um alimento constituído por água, carboidratos, proteínas, lípidos e sais minerais (SANTOS; FONSECA, 2007), o leite é considerado um alimento completo e um meio de cultura favorável à multiplicação bacteriana (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008; BELOTI, 2015). Esses micro-organismos utilizam constituintes do leite como substrato para obtenção de energia, conseqüentemente, multiplicam-se e causam a deterioração do

produto. A microbiota contaminante do leite pode ser dividida conforme o metabolismo predominante entre sacarolíticos, proteolíticos e lipolíticos.

2.3.1 Sacarolíticos

Os micro-organismos que utilizam a lactose do leite como substrato preferencial pertencem ao grupo dos sacarolíticos, ou seja, utilizam-se de carboidratos para obtenção de energia (JAY, 2005). A degradação da lactose é realizada pela enzima β -D-galactosidase (lactase), que catalisa a reação de hidrólise da lactose em β -D-galactose e α -D-glicose. A temperatura ótima para ação enzimática é de 35°C e pH de 6,9 a 7,3. Como a lactase melhor atua em temperatura alta e a catálise exige alta energia de ativação, o metabolismo sacarolítico é favorecido quando o leite é mantido em temperatura ambiente após a ordenha, sem refrigeração (ANDRADE, 2005).

Os principais grupos de micro-organismos responsáveis pela degradação da lactose no leite são as bactérias ácido lácticas e os coliformes. Os coliformes são bactérias Gram negativas que indicam contaminação do leite de origem ambiental e/ou fecal (FRANCO; LANDIGRAF, 2008).

A lactose é degradada em ácido láctico, responsável pelo aumento da acidez Dornic e consequente instabilidade de proteínas do leite à prova do alizarol, além de tornar o índice crioscópico mais negativo (TRONCO, 2008; BELOTI, 2015).

Conforme descrito, a refrigeração do leite controla a multiplicação dos micro-organismos mesófilos, predominantemente sacarolíticos. No entanto, os psicrotóxicos podem ativar vias metabólicas alternativas, adaptando-se ao crescimento em temperaturas de refrigeração independentemente da sua temperatura ótima de multiplicação (SANTANA et al., 2001), continuando a deteriorar o leite mantido sob refrigeração, principalmente as proteínas e a gordura. Os micro-organismos que utilizam proteínas e lipídios são chamados de proteolíticos e lipolíticos, respectivamente.

2.3.2 Proteolíticos

No leite, as enzimas proteolíticas de natureza bacteriana agem, em sua maioria, sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite, de forma análoga à quimosina (FAIRBAIRN; LAW, 1986; RECIO et al., 2000). Esta categoria de enzimas está relacionada a problemas tecnológicos, incluindo a sedimentação e geleificação do leite UHT, a formação de aminoácidos indesejáveis durante a

maturação de queijos e o desenvolvimento de sabor amargo em leite e em produtos lácteos (CELESTINO et al., 1997; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Principalmente os micro-organismos Gram negativos, como *Pseudomonas* spp. são importantes produtores de proteases (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007; XIN et al., 2017). A principal protease sintetizada é a metaloprotease alcalina, importante enzima microbiana que interfere na qualidade dos produtos lácteos e contribuem para o potencial biotecnológico desses micro-organismos (ERTAN et al., 2015; KUDDUS; RAMTEKE, 2012) na síntese de enzimas destinadas à fabricação de detergentes. A ligação da enzima com cátions, na maioria metálicos, confere maior estabilidade à estrutura terciária e favorece a resistência a tratamentos térmicos (STOECKEL et al., 2016).

No leite, pela disponibilidade de cálcio, essas enzimas apresentam maior resistência térmica (ERTAN et al., 2015). No leite UHT, a hidrólise contínua da caseína por metaloproteases durante a longa vida útil causa geleificação (MATÉOS et al., 2015; STUKNYTĖ et al., 2016) e nos produtos lácteos fermentados ou maturados causam sabor amargo (FAIRBAIRN; LAW, 1986), principalmente pelo fato dessas enzimas manterem atividade proteolítica em variações de pH entre 5 e 10 (MATÉOS et al., 2015).

O controle da microbiota psicrotrófica no leite constitui um fator importante para assegurar a qualidade de produtos lácteos, já que esses micro-organismos utilizam principalmente a proteólise e lipólise para multiplicação. Pesquisas mostram que a contaminação do leite por bactérias psicrotróficas proteolíticas é frequente (MOREIRA; MONTANHINI, 2014; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2015c). Adams et al. (1976) observaram a presença de bactérias psicrotróficas produtoras de proteases resistentes ao tratamento térmico de 149°C, por 10 segundos, em 90% das amostras de leite cru avaliadas.

Adams et al. (1976) registraram um decréscimo de 10 a 20% na concentração de κ -caseína, após dois dias de estocagem a 5°C, na presença de 10^5 UFC/mL de *Pseudomonas* spp., considerado o principal gênero de bactérias proteolíticas (JAY, 2005; HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007; XIN et al., 2017). Embora sejam psicrotróficas e muito sensíveis aos tratamentos térmicos, as proteases de *Pseudomonas* spp., principalmente a metaloprotease alcalina, podem ser estáveis a altas temperaturas e resistentes à pasteurização e ao tratamento UHT, entretanto não são ativas acima de 50 a 60°C.

Além de *Pseudomonas* e outros Gram negativos, bactérias Gram positivas como *Bacillus* e *Paenibacillus* são importantes produtoras de proteases, com o agravante de serem termodúricas e esporuladas, apresentando formas de sobrevivência aos tratamentos térmicos (SCHELDEMAN et al., 2004; 2005; HUCK et al., 2007).

2.3.3 Lipolíticos

Assim como os proteolíticos, os micro-organismos lipolíticos têm fundamental importância para o leite, uma vez que as lipases podem ser responsáveis pela alteração de características sensoriais no leite fluido, bem como pela rancificação em queijos (CHEN et al., 2003; FUQUAY et al., 2011)

De acordo com Chen et al. (2003), a lipólise resulta da ação de lipases naturais e/ou microbianas. Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, capríco, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelo aparecimento de odores indesejáveis no leite.

As bactérias produzem duas diferentes classes de enzimas lipolíticas, as carboxilesterases e as fosfolipases. As carboxilesterases hidrolisam pequenas moléculas de ésteres que são praticamente hidrossolúveis. Por outro lado, as fosfolipases ou lipases verdadeiras exibem atividade máxima na degradação de ácidos graxos de cadeia longa, moléculas insolúveis em água (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Entre os principais micro-organismos lipolíticos estão os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, que são também proteolíticos. As lipases bacterianas também são termoestáveis (ARPIGNY; JAEGER, 1999; FUQUAY et al., 2011).

2.4 INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DO LEITE CRU NA VIDA ÚTIL DO LEITE PASTEURIZADO

Os micro-organismos contaminantes do leite cru estão relacionados diretamente com a qualidade e vida útil do leite processado e dos derivados. Principalmente em decorrência da produção de exoproteases e lipases termoestáveis, os micro-organismos deteriorantes influenciam negativamente a qualidade do leite processado mesmo após a inativação das formas celulares vegetativas pelo processamento térmico.

Outros micro-organismos que constituem a microbiota do leite cru podem resistir à pasteurização nas formas vegetativas ou esporuladas. Entre eles, alguns podem apresentar atividade proteolítica e/ou lipolítica, continuando a atuar na deterioração do produto durante a sua vida útil. Por isso, é importante que se conheça as fontes de contaminação do leite cru por esses micro-organismos e evitar que eles entrem em contato direto ou indireto com o leite, minimizando os problemas causados por esses micro-organismos na qualidade do leite pasteurizado e dos derivados.

2.4.1 Micro-organismos Termodúricos

A vida útil do leite pasteurizado está diretamente relacionada com a quantidade de micro-organismos termodúricos mesófilos e termodúricos psicrotróficos, que além de importantes produtores de enzimas deteriorantes, são resistentes à pasteurização, passando a compor a microbiota remanescente no leite pasteurizado (JAY, 2005; FUQUAY et al., 2011). Apresentam propriedades termodúricas os gêneros *Micrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, entre outros. Parte desses termodúricos são originários da germinação de esporos, que também podem contaminar o leite (BUEHNER et al., 2014).

Nos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration* (FDA) declarou que termodúricos, termófilos, psicrotróficos e bactérias formadoras de esporos constituem a maior ameaça à deterioração de produtos lácteos (HULL et al., 1992; RÜCKERT et al., 2004).

O processo de esporulação está relacionado às situações adversas à manutenção das células vegetativas no meio (TORTORA et al., 2013). São descritos dois principais gêneros de micro-organismos que possuem a capacidade de esporulação: *Bacillus* e *Clostridium*, cujo habitat predominante é o solo (MADIGAN et al., 2010).

Os esporos são altamente resistentes ao calor e podem sobreviver ao processamento UHT (ESPEJO et al., 2014). No leite cru, os esporos aeróbios de *Bacillus* e *Clostridium* podem estar presentes. Os esporos de bactérias especialmente têm maior interesse por ser a aerobiose a condição verificada no leite fluido e na maioria dos seus derivados (SCHELDEMAN et al., 2004). Os esporos compõem a microbiota do leite pasteurizado e são especialmente significativos em leite em pó, devido ao efeito de concentração (HILL; SMYTHE, 2012).

Os endoesporos são metabolicamente inertes, possuem parede celular espessa, apresentam 10% da quantidade de água observada nas células vegetativas e são resistentes ao calor, dessecação, radiação e compostos químicos tóxicos (desinfetantes) (MADIGAN et al., 2010; TORTORA et al., 2013).

A contaminação do leite cru por esporos bacterianos é originária do solo (VISSERS et al., 2007), alimentos dos animais (HULL et al., 1992; BUEHNER et al., 2014), água (TORP et al., 2001), fezes (HULL et al., 1992), tetos (CHRISTIANSSEN et al., 1999) e equipamentos de ordenha (GIFFEL et al., 2002). Vissers et al. (2007) estimaram que 33% da contagem de esporos no leite é oriunda do solo.

Além de termodúricos, alguns micro-organismos formadores de esporos possuem a capacidade de multiplicação em altas temperaturas e são considerados termofílicos (JAY, 2005; FUQUAY et al., 2011). Esses micro-organismos e seus esporos têm fundamental

importância para a indústria de laticínios, uma vez que podem se aderir em placas de pasteurização, contaminar o leite processado e resistir ao processo de limpeza e sanitização dos sistemas (MURPHY et al., 2016).

No Quadro 3 estão apresentadas as principais espécies de micro-organismos esporulados termodúricos e/ou termofílicos e suas respectivas frequências de isolamento no leite cru em diferentes países.

Quadro 3. Micro-organismos esporulados termodúricos e/ou termofílicos isolados do leite cru em diversos países.

País	Micro-organismo	(n)	(%)	Referência
Bélgica	<i>Bacillus licheniformis</i>	603	22,3	Scheldeman et al. (2005)
	<i>Bacillus pallidus</i>		15,1	
	<i>Paenibacillus</i> spp.		10,2	
	<i>Brevibacillus borstelensis</i>		7,2	
	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>		6,6	
Bélgica	<i>Bacillus licheniformis</i>	318	57,1	Coorevits et al. (2008)
	<i>Bacillus pumilus</i>		37,7	
Uruguai	<i>Bacillus licheniformis</i>	207	52,8	Reginensi et al. (2011)
	<i>Bacillus flavithermus</i>		18,7	
	<i>Bacillus subtilis</i>		9,3	
	<i>Bacillus megaterium</i>		8,3	
	<i>Bacillus pumilus</i>		5,7	
China	<i>Bacillus licheniformis</i>	801	36,8	Yuan et al. (2012)
	<i>Bacillus flavithermus</i>		23,7	
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>		20	
Estados Unidos (Inverno)	<i>Bacillus licheniformis</i>	85	62	Buehner et al. (2014)
	<i>Bacillus subtilis</i>		9	
	<i>Bacillus sonorensis</i>		8	
	<i>Bacillus pumilus</i>		6	
Estados Unidos (Verão)	<i>Bacillus licheniformis</i>	83	49	
	<i>Bacillus sonorensis</i>		12	
	<i>Bacillus pumilus</i>		11	
Estados Unidos	<i>Bacillus licheniformis</i>	595	47,4	Miller et al. (2015)
	Outros <i>Bacillus</i> spp.		10,8	
	<i>Bacillus pumilus</i>		9,1	
	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>		6,4	
	<i>Bacillus clausii</i>		5,2	
	<i>Bacillus subtilis</i>		4,9	
	<i>Bacillus cereus</i>		4,7	
	<i>Paenibacillus</i> spp.		4,2	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os micro-organismos deteriorantes, proteolíticos, lipolíticos, termodúricos, esporulados, entre outros, podem ser quantificados no leite e, a partir dessas contagens, pode-

se estimar tanto a qualidade quanto o potencial de aparecimento de problemas tecnológicos nos derivados, seja em virtude da presença de enzimas deteriorantes ou devido ao comprometimento da integridade dos constituintes do leite. No entanto, métodos microbiológicos tradicionais, que envolvem o cultivo microbiano, requerem, no mínimo, 48 horas para a obtenção de resultados consistentes. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos para quantificação desses micro-organismos no leite cru ou, ainda melhor, evitar a contaminação do leite cru por micro-organismos com atividade proteolítica e lipolítica.

2.5 AVANÇOS NA PESQUISA DA MICROBIOTA DETERIORANTE AUTÓCTONE DO LEITE CRU REFRIGERADO BRASILEIRO

2.5.1 Contagem de Proteolíticos e Lipolíticos

Os resultados das contagens de micro-organismos proteolíticos e lipolíticos em leite cru refrigerado de diferentes origens podem ser observados nos Quadros 4 e 5, respectivamente, descritos por Ribeiro Júnior et al. (2015c). É possível verificar grandes produtores de leite do estado do Paraná, da bacia leiteira de Castro, que utilizam de boas práticas de higiene na ordenha e tecnologia aplicada à produção, apresentam médias de contagens de micro-organismos deteriorantes significativamente menores em relação aos pequenos produtores, tanto do estado do Paraná quanto do Maranhão.

Quadro 4. Micro-organismos proteolíticos de amostras de leite cru refrigerado oriundas de pequenos (n = 50) e grandes (n = 20) produtores do estado do Paraná (PR) e de pequenos (n = 10) produtores do estado do Maranhão (MA) no período de novembro de 2013 a novembro de 2014.

	Pequenos (PR)	Grandes (PR)	Pequenos (MA)	Todas as amostras
Mínimo (UFC/mL)	$2,1 \times 10^3$	4×10^1	$1,5 \times 10^4$	4×10^1
Máximo (UFC/mL)	$4,6 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$
Média* (UFC/mL)	1×10^{6a}	$1,4 \times 10^{4c}$	$1,1 \times 10^{5b}$	5×10^5
Mediana (UFC/mL)	$5,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	$5,5 \times 10^4$	3×10^4
Desvio Padrão	$\pm 1,2 \times 10^6$	$\pm 5,7 \times 10^4$	$\pm 1,3 \times 10^5$	$\pm 9,6 \times 10^5$

Fonte: Ribeiro Júnior et al. (2015c)

Quadro 5. Micro-organismos lipolíticos de amostras de leite cru refrigerado oriundas de pequenos (n = 50) e grandes (n = 20) produtores do estado do Paraná (PR) e de pequenos (n = 10) produtores do estado do Maranhão (MA) no período de novembro de 2013 a novembro de 2014.

	Pequenos (PR)	Grandes (PR)	Pequenos (MA)	Total das amostras
Mínimo (UFC/mL)	5×10^2	2×10^2	$2,7 \times 10^4$	2×10^2
Máximo (UFC/mL)	$2,5 \times 10^7$	$5,5 \times 10^3$	$6,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7$
Média* (UFC/mL)	$1,8 \times 10^{6a}$	$1,2 \times 10^{3c}$	2×10^{5b}	$8,6 \times 10^5$
Mediana (UFC/mL)	2×10^5	9×10^2	$1,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$
Desvio Padrão	$\pm 4,9 \times 10^6$	$\pm 1,1 \times 10^3$	$\pm 2,1 \times 10^5$	$\pm 3,4 \times 10^6$

Fonte: Ribeiro Júnior et al. (2015c)

2.5.2 Aeróbios Mesófilos

No Quadro 2 é possível verificar a distribuição das contagens de aeróbios mesófilos no leite cru refrigerado produzido por pequenos e grandes produtores de leite do estado do Paraná, no qual também pode-se confirmar a maior qualidade microbiológica do leite cru refrigerado produzido nas grandes propriedades.

Apesar das baixas contagens (média $1,5 \times 10^4$ UFC/mL), Mareze (2017) identificou entre as cepas de aeróbios mesófilos do leite de grandes produtores do estado do Paraná, 172 isolados com algum tipo de atividade deteriorante, sendo 66 (38%) apenas proteolíticos, 57 (33%) simultaneamente proteolíticos e lipolíticos e 49 (29%) exclusivamente lipolíticos, com predomínio (83,72%) de bactérias Gram positivas. Dessa forma, mesmo o leite obtido de forma higiênica e com 95,24% das amostras de leite apresentando baixas contagens de aeróbios mesófilos (inferiores a 10^5 UFC/mL, Quadro 2), grande parcela da microbiota presente possui potencial de comprometimento do leite, especialmente as proteínas e gordura.

O estudo de Mareze (2017), avaliando também a composição da microbiota mesófila com atividade proteolítica e/ou lipolítica dos isolados do leite cru refrigerado dos grandes produtores do estado do Paraná (Quadro 6), identificou o predomínio de bactérias ácido lácticas (BAL) entre os Gram positivos, principalmente a espécie *Lactococcus garviae* (25%). Esses micro-organismos são esperados em amostras de leite que possuem a contaminação ambiental controlada. O mesmo estudo identificou entre os aeróbios mesófilos espécies frequentemente descritas como agentes etiológicos de mastites, enfermidade frequente em animais puros e de alta produção (SANTOS; FONSECA, 2007; BELOTI, 2015), como os das propriedades da bacia leiteira de Castro.

Quadro 6. Identificação das cepas mesofílicas com capacidade deteriorante isoladas do leite cru refrigerado de propriedades centro-orientais do Paraná, no período de novembro de 2013 a maio de 2014.

Identificação n(%)	Isolados por Grupo n(%)
Gram negativo – 30 (16,28%)	
<i>Acinetobacter</i> spp.	20 (11,62)
ni ¹	5 (2,90)
ni ¹	3 (1,74)
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	2 (1,16)
Gram positivo – 142 (83,72%)	
<i>Lactococcus garvieae</i>	43 (25)
<i>Enterococcus faecalis</i>	26 (15,11)
<i>Streptococcus dysgalactae</i>	13 (7,55)
<i>Staphylococcus simulans</i>	12 (6,97)
<i>Streptococcus uberis</i>	10 (5,81)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (5,23)
<i>Kurthia gibsonii</i>	9 (5,23)
<i>Bacillus licheniformis</i>	8 (4,65)
<i>Rothia terrae</i>	7 (4,06)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	3 (1,74)
<i>Bacillus</i> spp.	1 (0,58)
ni ¹	1 (0,58)
Total	172 (100)

¹Não foi possível a identificação da cepa isolada (ni)

Fonte: Mareze (2017)

A atividade proteolítica e/ou lipolítica dos aeróbios mesófilos identificados por Mareze (2017) estão representados na Figura 3, na qual pode-se verificar a ampla ocorrência da produção de enzimas capazes de hidrolisar as proteínas e a gordura do leite pelas diferenças percentuais de atividade proteolítica e/ou lipolítica das mesmas espécies de micro-organismos.

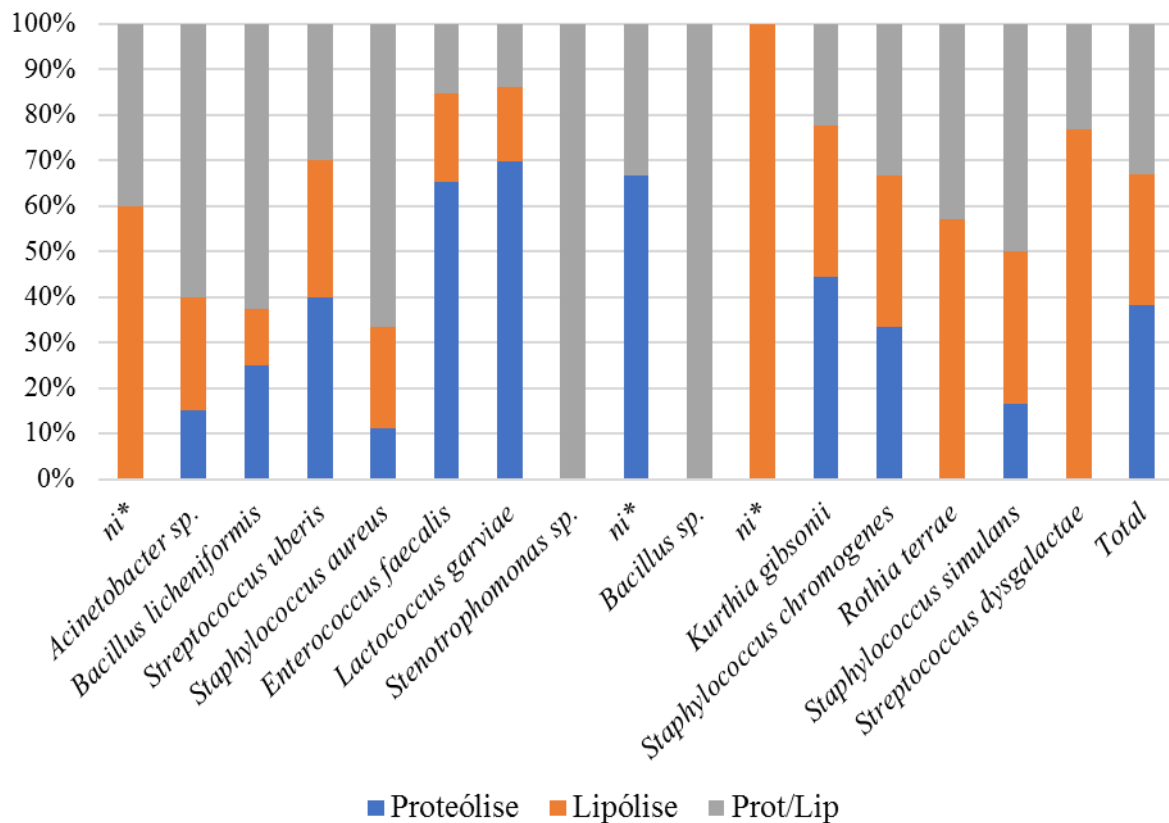


Figura 3. Distribuição e percentual das atividades proteolíticas e/ou lipolíticas de cepas mesofílicas isoladas de leite cru refrigerado da região de Castro-PR.

Fonte: Mareze (2017)

Estudo realizado por Lima (2016), com a finalidade de identificar bactérias mesófilas com atividade deteriorante em amostras de leite de pequenos produtores do estado do Maranhão, obteve 166 isolados, dos quais 120 (72,28%) apresentaram atividade lipolítica, 27 (16,26%) proteolítica e 19 (11,44%) potencial proteolítico e lipolítico simultaneamente. A identificação desses isolados pode ser verificada no Quadro 7. Nos Quadros 4 e 5, é possível verificar que as contagens de proteolíticos e lipolíticos, respectivamente, foram significativamente superiores em relação aos grandes produtores do estado do Paraná.

Além disso, o estudo de Lima (2016) evidencia que houve o predomínio de micro-organismos Gram negativos entre os aeróbios mesófilos deteriorantes nas amostras de leite do estado do Maranhão (Quadro 7), principalmente relacionado à contaminação de origem ambiental em decorrência da ausência de práticas de higiene na ordenha (BELOTI, 2015). *Klebsiella* spp. foi isolada em maior número por Lima (2016), pertence à família *Enterobacteriaceae*. Por ser eliminada nas fezes pode contaminar a água e o solo (QUINN et al., 2005), além de ser um agente infeccioso causador de mastite (PODDER et., 2014) e foi

isolada como bactéria deteriorante do leite cru no Brasil por Arcuri et al. (2008), Perin et al. (2012) e Nornberg et al. (2010).

Quadro 7. Cepas de bactérias mesófilas proteolíticas e/ou lipolíticas identificadas em 10 amostras de leite cru do Maranhão entre setembro e outubro de 2014.

Identificação de aeróbios mesófilos deteriorantes	Total de cepas
	n (%)
Espécies (8)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 (7,83)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7 (4,21)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5 (3,01)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 (1,20)
<i>Empedobacter falsenii</i>	2 (1,20)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 (1,20)
<i>Acinetobacter septicus</i>	1 (0,6)
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	1 (0,6)
Gêneros (8)	
<i>Klebsiella</i> spp.	95 (57,22)
<i>Acinetobacter</i> spp.	19 (11,44)
<i>Pseudomonas</i> spp.	6 (3,61)
<i>Bacillus</i> spp.	4 (2,40)
<i>Chryseobacterium</i> spp.	2 (1,20)
<i>Microbacterium</i> spp.	2 (1,20)
<i>Brevibacillus</i> spp.	1 (0,6)
<i>Staphylococcus</i> spp.	1 (0,6)
Subespécie (1)	
<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	3 (1,80)
Total	166

Fonte: Lima (2016)

2.5.3 Psicrotróficos

Entre os micro-organismos psicrotróficos presentes em amostras de leite provenientes de pequenos produtores do estado do Maranhão, foram isoladas 27 cepas de bactérias deteriorantes, sendo 62,96% lipolíticas e 37,03% proteolíticas e lipolíticas (LIMA, 2016). A identificação desses isolados pode ser observada no Quadro 8, no qual pode ser verificado que, assim como no grupo dos aeróbios mesófilos, houve o predomínio de micro-organismos Gram positivos entre os psicrotróficos.

Quadro 8. Identificação das bactérias psicrotróficas deteriorantes isoladas do leite cru coletado de propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014.

Identificação	Total de cepas <i>n</i> (%)	Atividade deteriorante
<i>Enterococcus</i> spp.	12 (44,44)	9 lipo / 3 prot-lipo
<i>Lactococcus garvieae</i>	7 (25,98)	6 lipo / 1 prot-lipo
<i>Bacillus</i> spp.	2 (7,40)	prot-lipo
<i>Hafnia alvei</i>	2 (7,40)	prot-lipo
<i>Pantoea</i> spp.	2 (7,40)	lipo
<i>Brevibacillus agri</i>	1 (3,70)	prot-lipo
<i>Klebsiella</i> spp.	1 (3,70)	prot-lipo
Total	27 (100)	

Fonte: Lima (2016)

2.5.4 Termodúricos Psicrotróficos

Quanto aos micro-organismos termodúricos com a capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração, Ribeiro Júnior et al. (2017) verificaram que, mesmo no leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica, 40% das amostras de leite de grandes produtores do estado do Paraná apresentaram algum tipo de crescimento microbiano, sendo que todos os isolados apresentaram exclusivamente atividade proteolítica. A identificação revelou apenas um isolado de etiologia bacteriana, identificado como *Bacillus pumilus*, micro-organismo frequentemente descrito como componente da microbiota esporulada do leite (COOREVITS et al., 2008; REGINENSI et al., 2011; BUEHNER et al., 2014). Já 90,9% dos isolados encontrados por Ribeiro Júnior et al (2017) foram identificados como fungos: *Cladosporium cladosporioides* (60%), *Geotrichum candidum* (30%) e *Curvularia geniculatus* (10%).

Os resultados de Ribeiro Júnior et al. (2017) indicam que os micro-organismos do leite cru que resistem à pasteurização atuarão na proteólise do leite pasteurizado mesmo quando mantido sob refrigeração. Além disso, micro-organismos de etiologia fúngica também podem atuar como deteriorantes do leite pasteurizado. Isso reforça a importância da necessidade de controle da contaminação do leite cru por esses micro-organismos, mesmo no leite de baixa CBT, para que seja possível o aumento da vida útil do leite pasteurizado e maior potencial tecnológico do leite cru para a fabricação de derivados.

2.5.5 Esporos Aeróbios

Conforme relatado anteriormente, os micro-organismos esporulados são frequentemente descritos como os principais responsáveis pela redução da vida útil do leite pasteurizado nos Estados Unidos (SCHELDEMAN et al., 2004; 2005; HUCK et al., 2007; BUEHNER et al., 2014) que pode chegar a 28 dias. No Brasil, esses micro-organismos passam despercebidos pelo controle da qualidade uma vez que o leite pasteurizado produzido no país não atinge mais de 10 dias de validade. No entanto, com o incremento da qualidade microbiológica do leite, prevista pela legislação, esses micro-organismos ganharão importância para o controle da qualidade dos laticínios brasileiros pelo aumento do potencial tecnológicos do leite cru.

Nesse sentido, outros micro-organismos deteriorantes identificados no leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica da região de Castro/PR foram os micro-organismos esporulados. Esses resultados, descritos no trabalho de Ribeiro Júnior (2015a) apontam que, apesar de baixas contagens (média 302 UFC/mL), predominam no leite cru refrigerado brasileiro os mesmos micro-organismos esporulados do leite de outros países (Quadro 3), conforme pode ser observado no Quadro 9, sendo verificada a maior incidência da espécie *Bacillus licheniformis*, dos quais 95,5% dos isolados apresentaram potencial de hidrólise das proteínas e gordura do leite, simultaneamente.

Quadro 9. Potencial deteriorante de cepas de bactérias oriundas da germinação de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado da bacia leiteira da região de Castro, Paraná, coletadas no período de novembro de 2013 a maio de 2014.

Identificação	Total (n)	Proteolítico e lipolítico		Proteolítico		Lipolítico	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>Bacillus licheniformis</i>	22	21	95,5	1	4,5		
<i>Bacillus</i> spp.	11	8	72,7	1	9,1	2	18,2
<i>Paenibacillus</i> spp.	3	-	-	-	-	3	100
<i>Bacillus pumilus</i>	2	2	100	-	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i>	1	-	-	-	-	1	100
<i>Brevibacillus</i> spp.	1	-	-	-	-	1	100

Fonte: Ribeiro Júnior (2015a)

Paenibacillus spp. é um importante gênero de bactérias esporuladas isoladas do leite em diversos países (SCHELDEMAN et al., 2005; HUCK et al., 2007; MILLER et al., 2015) e, até então, nunca havia sido relatado em amostras de leite brasileiro. Juntamente com os esporos de *Bacillus*, *Paenibacillus* são responsáveis pela deterioração do leite pasteurizado nos estados Unidos, sendo que a sua germinação e atividade deteriorante são verificadas após 14 dias de pasteurização (HUCK et al., 2007). No leite cru refrigerado brasileiro a primeira descrição de isolamento de *Paenibacillus* foi relatada por Ribeiro Júnior et al. (2016), assim como a atividade lipolítica de todos os isolados desse gênero (Quadro 9).

Também pesquisando micro-organismos oriundos da germinação de esporos no leite, Lemos (2016) encontrou média de $2,69 \times 10^4$ UFC/mL nas amostras de pequenos produtores do estado do Maranhão, sendo isoladas 56 colônias com atividade deteriorante, das quais 81,36% apresentaram atividade lipolítica, 16,95% potencial proteolítico e lipolítico simultaneamente e 1,69% apresentou apenas atividade proteolítica. A identificação das bactérias esporuladas isoladas por Lemos (2016) pode ser verificada no Quadro 10.

Quadro 10. Identificação de cepas de bactérias deteriorantes formadoras de esporos isoladas de 10 amostras de leite cru de três regiões do estado do Maranhão entre setembro e outubro de 2014.

Identificação	Total de cepas
	n (%)
<i>Lysinibacillus massiliensis</i>	26 (46,42)
<i>Bacillus</i> spp.	19 (33,92)
<i>Brevibacillus</i> spp.	5 (8,92)
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	4 (7,14)
<i>Bacillus tequilensis</i>	1 (1,78)
<i>Bacillus licheniformis</i>	1 (1,78)

Fonte: Lemos (2016)

Diferentemente dos isolados identificados no estado do Paraná por Ribeiro Júnior (2015a) (Quadro 9), o estudo de Lemos (2016) isolou *Lysinibacillus*, um gênero de bactérias esporuladas com atividade deteriorante até então não identificados por estudos realizados em diferentes países. Isso pode estar relacionado às diferenças de composição da microbiota ambiental que entra em contato com o leite no estado do Maranhão, à baixa qualidade microbiológica do leite cru refrigerado relatada por Lemos (2016) ou ainda pelo

fato desse gênero ser uma nova classificação do gênero *Bacillus* e, portanto, não relatado por estudos anteriores. No entanto, ainda pouco se sabe sobre a influência desse novo gênero na vida útil do leite processado, bem elucidada em relação aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* (HUCK et al., 2007; RANIERI et al., 2009; 2012).

2.6 PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES E PERSPECTIVAS NA PESQUISA DESSES MICRO-ORGANISMOS

A partir dos resultados preliminares das pesquisas com micro-organismos deteriorantes do leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica da região de Castro (PR), é possível verificar a maior incidência de *B. licheniformis* (55%) entre os esporulados (RIBEIRO JÚNIOR, 2015a) e 4,65% de toda a microbiota mesófila (MAREZE, 2017). No estado do Maranhão, Lemos (2016) também isolou *B. licheniformis* entre os esporulados. Dessa forma, a contaminação do leite por *B. licheniformis* pode estar ocorrendo de forma direta pelo contato com o solo e poeira, como também indireta pela contaminação de utensílios e equipamentos mal higienizados ou com água contaminada com os esporos desses micro-organismos.

Entre os esporulados descritos por Ribeiro Júnior (2015a), também vale ressaltar a importância da espécie *B. pumilus*, que além de ter sido identificada entre os esporulados com atividade proteolítica e lipolítica (Quadro 9), também foi o único isolado bacteriano entre os termodúricos psicrotróficos (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017) das mesmas amostras de leite.

Outra bactéria esporulada que possui pronunciada atividade deteriorante identificada pelos trabalhos desenvolvidos nessa linha de pesquisa foi *Paenibacillus*. Apesar de pouco frequente no leite cru brasileiro, é um micro-organismo que possui importância na vida útil do leite pasteurizado (HUCK et al., 2007). Por isso, a medida que se progride com a qualidade microbiológica e, conseqüentemente, se incrementa a vida útil do leite pasteurizado brasileiro, é possível que apareçam problemas de qualidade em decorrência da germinação de esporos de *Paenibacillus*.

Além disso, deve-se ressaltar as novas classificações de *Bacillus*, como *Brevibacillus* e *Lysinibacillus*, o potencial deteriorante desses micro-organismos isolados do leite e sua repercussão na vida útil do leite pasteurizado e dos derivados. Da mesma forma, outros micro-organismos reconhecidamente deteriorantes, como *Pseudomonas* spp., também

devem ser o foco de trabalhos que verifiquem a sua diversidade, origem de contaminação do leite e medidas de higiene profiláticas que evitem a sua incorporação no leite.

2.7 ESTRATÉGIAS PARA A MELHORIA DA QUALIDADE E AUMENTO DA VIDA ÚTIL DO LEITE PASTEURIZADO

O controle da contaminação do leite cru por micro-organismos deteriorantes se mostra como a principal ferramenta para aumentar a vida útil do leite pasteurizado e derivados, e reduzir problemas em decorrência da ação de proteases e lipases, como a geleificação em leite UHT, por exemplo. As pesquisas desenvolvidas recentemente (RIBEIRO JÚNIOR, 2015a; LEMOS, 2016; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2016; MAREZE, 2017; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017) visam a identificação dos principais agentes microbianos deteriorantes, determinar os pontos de contaminação do leite cru por esses micro-organismos e estabelecer boas práticas de higiene na ordenha aperfeiçoadas para o controle de micro-organismos deteriorantes nas propriedades rurais.

No entanto, outras estratégias podem ser adotadas por produtores e laticínios para a redução da deterioração microbiana do leite. Por exemplo, a refrigeração imediata do leite após a ordenha, não permitindo que ocorra a adaptação da microbiota mesófila para multiplicação em temperatura de refrigeração. A redução do intervalo entre a obtenção e o processamento do leite cru, e a adequação da infraestrutura das indústrias, que devem evitar tubulações curvas, de difícil higienização (BELOTI, 2015). Embalagens adequadas para conservar as propriedades organolépticas e microbiológicas do leite pasteurizado também colaboram para o aumento da sua vida útil (PETRUS et al., 2010).

A partir da execução dessas estratégias e, principalmente, do controle dos micro-organismos produtores de proteases e lipases no leite cru, é possível a produção de leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica e potencial tecnológico e, a partir dele, a produção de leite pasteurizado de longa vida útil, leite UHT com menor risco de problemas tecnológicos e derivados nobres de alto rendimento.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 823-827, 1976.
- ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado) em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 97 p., 2005.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Milk and milk products. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, p.837-856, 1992.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2250-2255, 2008.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, 177-183, 1999.
- BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 15-19, 2006.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20. 2004.
- BAGLINIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; DE CARVALHO, A. F.; VANETTI, M. C. D. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 38-45, 2017.

BELOTI, V.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C. Impacto da implantação de boas práticas de higiene na ordenha sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 388, p. 5-10, 2012.

BELOTI, V. (ed.) **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Editora Planta, Londrina. 488p., 2015.

BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.; SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 78, p. 589-594, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 13, Seção 1, 21 setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 6, Seção 1, 31 dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 7, de 04 de maio de 2016. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 11, Seção 1, 04 de maio de 2016.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology: the Microbiology of Milk** 2.ed. London/New York: Elsevier Science Ltda, p.163-207, 1990.

BUEHNER, K. P.; ANAND, S.; GARCIA, A. Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 midwest dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 6777-6784, 2014.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; DE FREITAS, F. A. Diagnostic of antibiotic residues in milk samples from industrys with payment system for quality in southeastern region.

Veterinaria e Zootecnia, v. 20, p. 88-90, 2013.

CALDERA, L.; FRANZETTI, L.; VAN COILLIE, E.; DE VOS, P.; STRAGIER, P.; DE BLOCK, J.; HEYNDRICKX, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, v. 54, p. 142-153, 2016.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted uht-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of uht milk on its physico-chemical attributes and flavor. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 129-140, 1997.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 255-275, 2003.

CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 305-314, 1999.

COOREVITS, A.; JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; REEKMANS, R.; HEYRMAN, J.; MESSENS, W.; VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 126-140, 2008.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K.; MESSENS, W.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 460-470, 2011.

DUNSTALL, G.; ROWE, M. T.; WISDOM, G. B.; KILPATRICK, D. Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of *Pseudomonas* spp. of raw milk origin. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 276-280, 2005.

ERTAN, H.; CASSEL, C.; VERMA, A.; POLJAK, A.; CHARLTON, T.; ALDRICH-WRIGHT, J., OMAR, S. M.; SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. isolated from refrigerated milk: role of calcium in improving enzyme productivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 1-8, 2015.

ESPEJO, G. G. A.; HERNANDEZ HERRERO, M. M.; JUAN, B.; TRUJILLO, A. J. Inactivation of *Bacillus* spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. **Food Microbiology**, v. 44, p. 204-210, 2014.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Protease of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 139-177, 1986.

FRANÇA, A. I. M.; DA SILVA, M. A. P.; BARROS, J. C.; DA SILVA, M. R.; NEVES, R. B. S.; DO NASCIMENTO, L. E. C.; NICOLAU, E. S. Qualidade do leite cru refrigerado granelizado coletado no sudoeste goiano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, p. 316-325, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Atheneu, São Paulo, 2ª Ed., 182 p., 2008.

FRANQUE, M. P.; PEIXOTO, A. F.; PEREIRA, T. A.; DE SOUZA, I. B.; SILVA, E. O.; CHINELATE, G. C. B. Avaliação microbiológica e físico-química do leite cru comercializado em estabelecimentos comerciais da cidade de garanhuns-PE. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, p. 64-67, 2017.

FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (2nd ed.). Elsevier, London, 1009 p., 2011.

GIFFEL, M. C.; WAGENDORP, A.; HERREWEGH, A.; DRIEHUIS, F. Bacterial spores in silage and raw milk. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 625-630, 2002.

HANTSIS ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7162-7168, 2007.

HILL, B. M.; SMYTHE, B. W. Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: an industrial perspective. **Food Reviews International**, v. 28, p. 299-312, 2012.

HUCK, J. R.; HAMMOND, B. H.; MURPHY, S. C.; WOODCOCK, N. H.; BOOR, K. J. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4872-4883, 2007.

HULL, R. R.; TOYNE, S.; HAYNES, I. N.; LEHMANN, F. L. Thermotolerant bacteria: a re-emerging problem in cheesemaking. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 91-94, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Pecuária Municipal de 2015**. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ppm/default.asp>>. Acesso em: 01 junho de 2017.

JAY, M. J. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Artmed, Porto Alegre, 711 p., 2005.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, p. 330-338, 2012.

LE MOS, K. L. **Caracterização da microbiota deteriorante e perfil genético de bactérias esporuladas isoladas de leite cru bovino produzido no estado do Maranhão – Brasil**, Tese (Doutorado) em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 76p., 2016.

LIMA, J. B. A. **Caracterização genética de bactérias proteolíticas e lipolíticas autóctones do leite cru no Maranhão - Brasil**. Tese (Doutorado) em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 100p., 2016.

LIU, M.; WANG, H., GRIFFITHS, M. Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acetyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2174-2184, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock** (12^a ed.) Artmed, São Paulo, 1160 p., 2010.

MAREZE, J. **Identificação molecular de deteriorantes mesófilos em leite cru refrigerado**. Dissertação (Mestrado) em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 65p., 2017.

MATÉOS, A. M.; GUYARD-NICODÈME, F.; BAGLINIÈRE, J.; JARDIN, F.; GAUCHERON, A.; DARY, G.; HUMBERT, J. L.; GAILLARD, J. L. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 78-88, 2015.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 173-182, 2010.

MATSUBARA, M. T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; DA SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; PAVÃO, A. P. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 277-286, 2011.

McPHEE, J. D.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic bacteria *Pseudomonas* spp. In: JOHN, W.F. (Ed). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2 Ed. Academic Press, San Diego, p. 379-383, 2011.

MILLER, R. A.; KENT, D. J.; WATTERSON, M. J.; BOOR, K. J.; MARTIN, N. H.; WIEDMANN, M. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 8492-8504, 2015.

MOREIRA, N. V.; MONTANHINI, M. T. M. Contaminação do leite na ordenha por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, p. 29-38, 2014.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 10128-10149, 2016.

NASCIMENTO NETA, F. C. C.; DA SILVA JUNQUEIRA, M.; CARNEIRO, J. C. S.; RAMOS, M. D. P. P.; DE OLIVEIRA PINTO, C. L.; ROSÁRIO, D. K. A. Avaliação da qualidade de leite cru armazenado em tanques de refrigeração no município de Alegre, Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 6, p. 21-27, 2016.

NERO, L. A.; MATTOS, M. D.; BELOTI, V.; BARROS, M. D. A.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J. D.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 191-195, 2005.

NÖRNBERG, M. F.; FRIEDRICH, R. S.; WEISS, R. D.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 41-46, 2010.

OHI, M.; KNOPKI, A. C. G.; BEDNARSKI, F.; NASCIMENTO, L. V.; SILVA, L. B. **Princípios básicos para a produção de leite bovino**. Editora da UFPR, Curitiba, 144 p., 2010.

OLIVEIRA, G. B. D.; FAVARIN, L.; LUCHESE, R. H.; MCINTOSH, D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 313-321, 2015.

PERIN, L. M.; MORAES, P. M.; ALMEIDA, M. V.; NERO, L. A. Interference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 333-342, 2012.

PETRUS, R. R.; LOIOLA, C. G.; OLIVEIRA, C. A. F. Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 36-40, 2010.

PODDER, M. P.; ROGERS, L.; DALEY, P. K.; KEEFE, G. P.; WHITNEY, H. G.; TAHLAN, K. Klebsiella species associated with bovine mastitis in newfoundland. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-5, 2014.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed, Porto Alegre, p.129-130, 2005.

RANIERI, M. L.; HUCK, J. R.; SONNEN, M.; BARBANO, D. M.; BOOR, K. J. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4823-4832, 2009.

RANIERI, M. L.; IVY, R. A.; MITCHELL, W. R.; CALL, E.; MASIELLO, S. N.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5855-5863, 2012.

RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by action of psychrotrophic protease on κ sein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 625-630, 2000.

REGINENSI, S. M.; GONZÁLEZ, M. J.; OLIVERA, J. A.; SOSA, M.; JULIANO, P.; BERMÚDEZ, J. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 36-41, 2011.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 5-11, 2013.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; SHECAIRA, C. L.; SILVA, F. F.; PARREN, G. E.; BELOTI, V. Influência de boas práticas de higiene de ordenha na qualidade microbiológica do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 395-404, 2014.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. **Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. Dissertação (Mestrado) em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 78p., 2015a.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; BELOTI, V. Quality of milk produced by small and large dairy producers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 883-888, 2015b.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; LIMA, J. B. A.; LEMOS, K. L.; SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Proteolytic and lipolytic microbiota of refrigerated raw milk from northeast and southern regions of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 4289-4296, 2015c.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; ALCÂNTARA, B. K. D.; BELOTI, V. Spoilage potential of *Paenibacillus* sp. in Brazilian raw milk. **Ciência Rural**, v. 46, p. 637-640, 2016.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V.; MASSI, F. P.; FUNGARO, M. H. P. Thermotolerant psychrotrophic proteolytic microbiota from refrigerated raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, p. 267-272, 2017.

ROMA JÚNIOR, L. C.; MONTROYA, J. F. G.; MARTINS, T. T.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1411-1418, 2009.

RÜCKERT, A.; RONIMUS, R. S.; MORGAN, H. W. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 263-272, 2004.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACI C, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, p. 77-95, 2012.

SANDES, A. B.; SOARES, L. S.; SILVA, M. H.; SANTOS, É. S. V. Contagem de micro-organismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha não mecanizada e mecanizada de propriedades do recôncavo baiano. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 396-414, 2016.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 143-154, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria de qualidade do leite** (3ª ed.). Lemos Editorial, São Paulo, 328 p., 2007.

SCHELDEMAN, P.; GOOSSENS, K.; RODRIGUEZ-DIAZ, M.; PIL, A.; GORIS, J.; HERMAN, L.; VOS, P.; LOGAN, N. A.; HEYNDRIKX, M. *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 885-891, 2004.

SCHELDEMAN, P.; PIL, A.; HERMAN, L.; VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1480-1494, 2005.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 267-276, 2011.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science e Technology**, v. 8, p. 35-37, 1997.

STUKNYTĖ, M.; DECIMO, M.; COLZANI, M.; SILVETTI, T.; BRASCA, M.; CATTANEO, S.; ALDINI, G.; DE NONI, I. Extracellular thermostable proteolytic activity of the milk spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens* PS19 on bovine caseins. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 4188-4195, 2016.

STOECKEL, M.; LIDOLT, M.; STRESSLER, T.; FISCHER, L.; WENNING, M.; HINRICHS, J. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 250-261, 2016.

TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; OLIVEIRA, N. T. E.; BRAGA, G. C.; ZONIN, W. J. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 7-11, 2013.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. Part. 1. **Dairy Industry**, v. 38, p.11-15, 1973.

TORP, M.; HOLSTAD, G.; GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*: feeds and feces as major contamination sources in milk on a dairy farm. **Norsk Veterinærtidsskrift**, v. 113, p. 462-466, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**, 11 Ed. Pearson, Yorkshire, 975 p., 2013.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 Ed. UFSM, Santa Maria, 206 p., 2008.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, p. 181-188, 2009.

VISSERS, M. M. M.; DRIEHUIS, F.; GIFFEL, M. T.; JONG, P.; LANKVELD, J. M. G. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 928-936, 2007.

XIN, L.; MENG, Z.; ZHANG, L.; CUI, Y.; HAN, X.; YI, H. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 34-41, 2017.

YUAN, D. D.; LIU, G. C.; REN, D. Y.; ZHANG, D.; ZHAO, L.; KAN, C. P.; YANG, Y. Z.; MAA, W.; LI, Y.; ZHANG, L. B. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. **Food Control**, v. 25, p. 752-757, 2012.

ZHANG, S.; LI, H.; ULUKO, H.; LIU, L.; PANG, X.; LV, J. Investigation of Protease Production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and Degradation on Milk Proteins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 2466-2472, 2015.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar, a partir de métodos moleculares, a composição e diversidade da microbiota psicrotrófica e termodúrica mesófila, com atividade proteolítica e lipolítica, contaminantes do leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Quantificar as populações de bactérias psicrotróficas e termodúricas mesófilas em leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica;
- 3.2.2 Avaliar a atividade proteolítica e lipolítica de todos os isolados de psicrotróficos e termodúricos mesófilos obtidos a partir de amostras de leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica;
- 3.2.3 Verificar o potencial de produção de metaloprotease alcalina através da pesquisa do gene *aprX* em isolados de bactérias psicrotróficas que apresentaram atividade proteolítica;
- 3.2.4 Realizar o agrupamento filogenético de cepas de bactérias psicrotróficas e termodúricas utilizando de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e análise de bioinformática;
- 3.2.5 Obter sequências consensuais de alta qualidade do gene 16S rRNA de isolados de bactérias com potencial deteriorante do leite;
- 3.2.6 Realizar a caracterização de isolados de bactérias psicrotróficas e termodúricas mesófilas por análise filogenética com as sequencias tipo das espécies disponíveis no *Ribosomal Database Project* (RDP); e,
- 3.2.7 Determinar os principais micro-organismos psicrotróficos e termodúricos mesófilos com atividade proteolítica e lipolítica do leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica

4 ARTIGO A

Trabalho submetido ao Journal of Dairy Science

Parecer de correções encaminhado em 31 de julho de 2017

SPOILAGE POTENTIAL OF PSYCHROTROPHS FROM RAW MILK

The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk

J. C. Ribeiro Júnior*, A. M. de Oliveira*, F. de G. Silva*, R. Tamanini*, V. Beloti*†

The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. Ribeiro Júnior. Spoilage-related psychrotrophic microorganisms can compromise the quality of milk and dairy products. The main proteolytic and/or lipolytic microorganisms in Brazilian refrigerated raw milk have been identified and should be controlled to meet the international demand for high-quality dairy products and long shelf-life.

* Animal Products Inspection Laboratory, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

†Corresponding author: Vanerli Beloti, State University of Londrina, P. O. Box 10.011,

Londrina, Paraná, Brazil, Zip Code 86.057-970, +55 43 3371 5617, Fax: +55 43 3371 4485,

vbeloti@uel.br

ABSTRACT

Refrigerated raw milk may contain psychrotrophic microorganisms that produce thermoresistant exoproteases and lipases, which may compromise the quality of processed fluid milk and dairy products during storage. The aim of this work was to quantify and identify the deteriorating psychrotrophic microbiota in Brazilian refrigerated raw milk using genetic diversity analysis. The mean psychrotrophic count was 1.1×10^4 CFU/mL. Of the total isolates, 47.8% and 29.8% showed deteriorating activity at 35°C within 48 hours and 7°C within 10 days, respectively. Observed among the proteolytics were *Lactococcus lactis* (27.3%), *Enterobacter kobei* (14.8%), *Serratia ureilytica* (8%), *Aerococcus urinaeequi* (6.8%) and *Bacillus licheniformis* (6.8%). Observed among lipolytics were *E. kobei* (17.7%), *L. lactis* (15.6%), *A. urinaeequi* (12.5%) and *Acinetobacter lwoffii* (9.4%). The isolates *S. ureilytica*, *E. kobei*, *Pseudomonas* spp. and *Yersinia enterocolitica* potentially produced alkaline metalloprotease (*aprX*). Despite the low counts, a considerable portion of the psychrotrophic microbiota presented spoilage potential, which reaffirms the need for rigor in the control of contamination and the importance of rapid processing as factors that maintain the quality of milk and dairy products.

Key words: alkaline metalloprotease; diversity; lipolytic; proteolytic

INTRODUCTION

The cooling of raw milk allows for control of the multiplication of mesophyll microbiota, predominantly saccharolytic microorganisms (Das et al., 2015; Erich et al., 2015). These microorganisms are responsible for the acidification and thermal instability of milk proteins, as the hydrolysis of lactose produces lactic acid as a by-product (McAuley et al., 2016).

Some mesophilic microorganisms, called psychrotrophs, adapt to refrigeration temperatures by synthesizing phospholipids and neutral lipids containing increased proportions of unsaturated fatty acids, resulting in a reduction in the melting point of the lipids. This phenomenon serves to maintain their fluidity, thus allowing the continued functionality, solute transport, secretion of extracellular enzymes (Oliveira et al., 2015).

Some psychrotrophs produce and release proteases and lipases to the external environment and absorb the products of their hydrolysis (Cousin, 1982). In addition to compromising the integrity of the milk constituents, the microbial proteases and lipases are thermostable and can remain active even after the elimination of the vegetative microorganisms by heat treatments applied to the milk by the industry (Samarzija et al., 2012; Oliveira et al., 2015; Baglinière et al., 2017). Prolonged action of proteases and lipases may cause organoleptic changes in fluid milk or dairy products, such as a bitter or rancid taste in cheeses or gelation and sedimentation in ultra-high temperature (UHT)-treated milk (Fairbairn; Law, 1986; Matèos et al.2015; Zhang et al., 2015).

There is a global demand for dairy products with good quality and a long shelf-life. For pasteurized milk, which best preserves the nutritional and organoleptic aspects of raw milk (Andersson; Öste, 1994), there is a great expectation to increase its shelf life. For this to happen, it is necessary to keep contamination to a minimum and to control for specific microorganisms with great spoilage potential.

Several studies evaluated the composition of psychrotrophic microbiota in raw milk and its deteriorating activity (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; Mcphee and Griffiths, 2011; Gargouri et al., 2013; von Neubeck et al., 2015; Vithanage et al., 2016; Xin et al., 2017). However, different microbial community structures are found in raw cows' milk samples from different geographical areas (Xin et al., 2017), and under good environmental hygiene conditions in obtaining raw milk, other proteolytic and lipolytic psychrotrophic microorganisms can become important for milk quality. Studies that verify the diversity of these other microorganisms are essential to determine their dairy farm of origin and refine hygiene practices used to further reduce these specific microorganisms in raw milk. These practices could result in minimizing the effect of proteases and lipases in processed milk, thereby increasing its shelf life, the integrity of its constituents and consequently, the industrial yield.

The aims of this study were to quantify psychrotrophic microorganisms in Brazilian refrigerated raw milk, to verify the proteolytic and lipolytic activity of the isolates at mesophilic and psychrotrophic temperatures, to ascertain the potential of alkaline metalloprotease production and to identify these contaminant microorganisms.

MATERIAL AND METHODS

We evaluated 20 refrigerated raw milk samples produced in the municipalities of Castro and Arapoti, in the central region of the state of Paraná, Southern Brazil. Each sample was collected from a different farm. These dairy farms were previously characterized (Ribeiro Júnior et al., 2015) and are part of the largest association of milk producers in southern Brazil. The milk produced on these farms is sent to the dairy company of the association for the production of noble dairy products and fluid milk. The samples were aseptically collected from the bulk tanks on the dairy farms and transported under refrigeration to the Laboratório

de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) of the State University of Londrina, Paraná, Brazil.

The raw milk samples were diluted (10^0 until 10^3) in saline (0.9%) and peptone (0.01%) for total bacterial count (TBC), performed by seeding into Petrifilm™ AC (3M Microbiology, Minnesota, USA), followed by incubation at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h. The psychrotrophic count was performed by adding samples (0.1 mL) in duplicate on the surface of plate count agar (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). The plates were inverted and incubated at 7°C for 10 days.

All bacterial colonies on the plates used for counting psychrotrophs (one plaque from the duplicate) were purified in plates of standard agar and were retested on milk agar (Acumedia, Baltimore, USA) supplemented with 10% reconstituted skimmed milk powder solution (10%) and on tributyrin agar (HiMedia, Mumbai, India) supplemented with 1% tributyrin (HiMedia) to verify the proteolytic and lipolytic potential, respectively (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). Plates were incubated for 48 h at 35°C and for 10 d at 7°C .

The isolates that presented with proteolytic and/or lipolytic activity were cultured in Brain Heart Infusion Broth (Acumedia, Baltimore, USA), incubated at 35°C for 48 h and subjected to genomic DNA extraction by simple boiling as in Ribeiro Júnior et al. (2016). The products of the extraction of the isolates that presented proteolytic activity in the plates were subjected to PCR for the *aprX* gene to verify the alkaline metalloprotease production potential (Table 1).

All extracts were subjected to amplification of the internal transcript spacer (ITS) region 16-23S rRNA using the primers and conditions described in Table 1. The PCR was performed with approximately 50 ng DNA template, 100 nM of each deoxynucleotide, 5 μL of 10X buffer, 75 mmol L^{-1} MgCl_2 , 20 pmol L^{-1} of each primer, and 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Amplification was performed in a thermocycler

(Aeris™ Thermal Cycler, Esco® Micro Pte. Ltd., Singapore) and the PCR-amplified DNA samples were loaded onto a 1% agarose gel (Invitrogen) to be subjected to electrophoresis for 1 hour at a constant voltage of 90 V. The gels were stained with an ethidium bromide solution of 0.2 mg/mL for 20 minutes before visualization. Images were saved after UV transillumination.

The amplicons of the ITS region were subjected to restriction by 2 U via the enzyme Cfo I (Promega, Madison, USA), using the reaction protocol described by the manufacturer. The amplified DNA and enzyme mixtures were incubated for 1 hour at 37°C in a thermocycler. Restriction products were subjected to agarose gel electrophoresis (1.5%) for 1 hour at a constant voltage of 70 V. The gels were stained with an ethidium bromide solution of 0.2 mg/mL and documented.

The amplification profiles of the ITS regions of each isolate, together with its product of restriction by the enzyme Cfo I, were used as genomic variables to construct a dendrogram of phylogenetic similarity (Ranjard et al., 2001) using Bionumerics v. 1.50 software (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium). The similarity matrix Dice coefficient (Dice, 1945) and the unweighted pair group mean averages (UPGMA) algorithm (Sneath; Sokal, 1973) were used. To determine the clusters, a minimum of 70% phylogenetic similarity was used.

A representative sample from each cluster was selected for partial amplification of the 16S rRNA gene using the primers and conditions described in Table 1. The products of this PCR were purified (PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen) and quantified (Qubit® dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen) for DNA sequencing using the Sanger method (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA), which was completed in both directions.

The quality of the sequences was evaluated by the software BioEdit v. 7.2.5 (Hull, 1999), and the consensus sequences were generated by CAP 3 (Huang; Madan, 1999). These sequences were individually aligned using Clustal W and the representative sequences of each genus available in the Ribosomal Database Project (RDP), and genetic similarity was analyzed via the Neighbor joining method and the Tamura-Nei model using bootstrap support for 1000 replications in the MEGA v. 7.0 software (Kumar et al., 2016).

RESULTS AND DISCUSSION

The TBC of the raw milk samples varied from 6.8×10^2 to 1.5×10^5 CFU/mL, with a mean of 1.5×10^4 CFU/mL. It was observed that 95% of the 20 milk samples have a TBC of less than 10^5 CFU/mL. Psychrotrophic counts ranged from 10^1 to 2.1×10^5 CFU/mL with a mean of 1.1×10^4 CFU/mL. Considering the mean values, the psychrotrophic count represents 78.3% of the TBC.

These results demonstrate the high microbiological quality of the samples, since the psychrotrophic count, a parameter considered by Ercolini et al. (2009) to determine the quality of raw milk samples in Italy, was higher than 10^5 CFU/mL in only one sample. According to Matta et al. (1997), the deterioration of milk by psychrotrophs is perceptible when the count reaches 10^6 CFU/mL.

Of the plaques used to count the 20 milk samples evaluated in the present study, only 295 isolates of psychrotrophic bacteria were obtained. The low recovery of strains was proportional to these low bacterial counts: of the 5 milk samples, only 3 isolates were obtained from each plate with no diluted raw milk samples. In total, 141 (47.8%) samples showed deteriorating milk activity at mesophilic incubation ($35^\circ\text{C}/48$ h), 43 (30.5%) were both proteolytic and lipolytic, and 45 (31.9%) and 53 (37.6%) were exclusively proteolytic or lipolytic, respectively (Table 2). At refrigeration temperature ($7^\circ\text{C}/10$ d), 88 (29.8%) colonies

showed spoilage potential in the milk, 29 (20.6%) and 38 (27%) were proteolytic or lipolytic, respectively, and 21 (14.9%) presented both deteriorating activities.

All deteriorating milk isolates were subjected to amplification of the ITS region, restriction digestion with the Cfo I enzyme, phylogenetic grouping for subsequent sequencing of the 16S rRNA gene and identification by clustering. The similarity dendrogram for the isolates that presented proteolytic activity is represented in Figure 1, where it is possible to observe the determination of 36 clusters with 70% similarity. Figure 2 shows the phylogenetic similarity dendrogram for the lipolytic microorganisms, in which 47 clusters were determined. Identification at the species level was not possible in 4 of the isolates (2 *Pseudomonas*, 1 *Acinetobacter* and 1 *Pantoea*), as shown in Table 2.

Regarding cluster dynamics, Figures 1 and 2 verify that the same species were identified in different clusters, representing the different genetic profiles of the isolates determined by the polymorphic profile variables in the amplicons of the ITS region and consequently, by the restriction products from the enzyme Cfo I. The high genetic variability of deteriorating psychrotrophs was also observed by Martins et al. (2006) using genetic grouping by profile in random amplified polymorphic DNA.

It can be verified that the species *L. lactis*, *E. kobei*, *A. urinaeequi*, *A. lwoffii*, *K. gibsonii*, and *S. ureilytica* predominated among the deteriorating psychrotrophic microbiota of the raw milk from this sample unit. It can also be observed that Gram-positive deteriorating microorganisms were also predominant (58.2%); these organisms are often related to the initial and desirable microbiota of milk, as well as to the environment of the stables, feed for the animals and infections of the mammary gland.

In Table 2, it is possible to observe that the species *E. kobei* (18.6%), *S. ureilytica* (16.7%), *A. urinaeequi* (14%) and *L. lactis* (9.3%) predominated among the microorganisms that

presented simultaneous proteolytic and lipolytic activity at mesophilic incubation. Among the 45 isolates that showed only proteolytic activity, the most frequently observed species were *L. lactis* (44.4%), *E. kobei* (11.1%), *B. licheniformis* (11.1%), *K. gibsonii* (8.9%) and *M. caseolyticus* (8.9%), and of the 53 purely lipolytic isolates, *L. lactis* (20.8%), *E. kobei* (17%), *A. lwoffii* (13.2%), *A. urinaeequi* (11.3%), and *S. epidermidis* (7.5%) predominated.

Considering the deterioration potential at refrigeration temperature, the predominant species were *S. ureilytica* (75%), *A. urinaeequi* (13.6%) and *L. lactis* (8.6%) for simultaneous proteolytic and lipolytic activity, *L. lactis* (51.4%) and *A. urinaeequi* (25%) among the proteolytic psychrotrophs and *A. lwoffii* (88.9%) and *E. kobei* (31.9%) among the lipolytics.

The 88 proteolytic isolates at mesophilic incubation were tested for alkaline metalloprotease production potential, and 15 (17%) showed a positive PCR reaction for the *aprX* gene. Of these, 5 (33.3%) were identified as *S. ureilytica*, 5 (33.3%) as *E. kobei*, 2 (13.3%) as *Pseudomonas* spp., 1 (6.7%) as *A. urinaeequi*, 1 (6.7%) as *Y. enterocolitica* and 1 (6.7%) as *Stenotrophomonas rhizophila*.

Alkaline metalloprotease production is generally related to the microorganisms of the genus *Pseudomonas*, and mainly to the species *P. fluorescens* (Scatamburlo et al., 2015). *Pseudomonas* has been reported as predominant among the deteriorating psychrotrophs of refrigerated raw milk (von Neubeck et al., 2015; Xin et al., 2017). In the present study, only 1.4% of the deteriorating psychrotrophic microbiota from the milk was of the *Pseudomonas* genus (Table 2), and the two isolates presented a positive result for the *aprX* gene. The low frequency of the genus *Pseudomonas* in the evaluated milk samples can be explained by the good microbiological conditions present while obtaining the milk and by the farm properties' use of treated water with low environmental contamination.

Considering the totality of the evaluated psychrotrophic microbiota (141 isolates) from refrigerated raw milk, the predominance of 35 strains (24.5%) identified as *L. lactis* was observed, of which 68.6% presented proteolytic activity and 42.9% presented lipolytic capacity in plaques incubated at mesophilic temperature. In psychrotrophic conditions, 51.4% and 17.1% are proteolytic and lipolytic, respectively. In contrast, Ercolini et al. (2009) did not verify the proteolytic activity of the isolates of *L. lactis*, nor their growth at 7°C, demonstrating that the expression of deteriorating enzymes or the temperature of multiplication can vary according to the strain of the microorganism.

The refrigerated raw milk samples evaluated in the present study were obtained from dairy farms that have good hygiene conditions at milking and a consistent investment in milk quality (Ribeiro Júnior et al., 2015). It was expected that lactic acid bacteria such as *L. lactis* (Holzapfel et al., 2001) would predominate, as these microorganisms constitute the autochthonous and desirable microbiota of milk; in contrast, milks with higher TBC generally show a predominance of Gram-negative psychrotrophic microorganisms (Sørhaug and Stepaniak, 1997; Mcphee and Griffiths, 2011; Oliveira et al., 2015; Xin et al., 2017).

In addition to lactic acid bacteria, other microorganisms were evaluated in the present study; these may have originated from cases of mastitis, a common disease in high production animals (such as those in dairy farms) and include *Staphylococcus* (Felipe et al., 2017; Guimarães et al., 2017), *Streptococcus* (Taponen et al., 2017) and *Aerococcus* (Saishu et al., 2015).

Bacillus is another psychrotrophic Gram-positive microorganism associated with spoilage identified in the present study; the species *B. licheniformis* and *B. pumilus* are psychrotrophic, frequently reported as thermotolerant and thermophilic sporulated microorganisms (Huck et al., 2007; Buehner et al., 2014; Pinto et al., 2017), and found in dry matter such as silage

(Gleenson et al., 2013; Buehner et al., 2014). These microorganisms have an influence on the shelf life of pasteurized milk.

Contamination of milk by Gram-negative microorganisms is usually associated with a humid environment, equipment and the water used to clean the systems for obtaining and storing milk (Dogan, Boor, 2003; Oliveira et al., 2015). The small number of Gram-negative microorganisms identified among the spoilage psychrotrophs in the present study reaffirms the good environmental hygiene conditions present while obtaining the raw milk.

It was verified that 87.5% of the isolates identified as *S. ureilytica* presented proteolytic and lipolytic activity at 35°C/48 h and 75% at 7°C/10 d. This species was also the one showing the highest frequency of the *aprX* gene, which makes it a potential producer of alkaline metalloprotease. According to Bagliniere et al. (2017), *Serratia* strains are able to synthesize two types of proteases, Ser1 and Ser2. Ser2 has an impact similar to the alkaline metalloprotease produced in the expression of the *aprX* gene, with a broad spectrum of action on caseins and implications for the shelf life of UHT milk. However, a study by Ercolini et al. (2009) reports proteolytic activity of *S. marcescens* at only 20 and 30°C, not at 7°C. This result demonstrates the intermittence of protease synthesis and the possible temperature interference, among other factors, in the expression of the *aprX* gene.

E. kobei was the primary psychrotrophic Gram-negative microorganism in the raw refrigerated milk isolated in the present work, representing 15.4% of the microbiota (Table 2). Of the isolates of this species, 22.7% were positive for the alkaline metalloprotease production potential (*aprX* gene). This species was also the most frequently identified among lipolytic psychrotrophic microorganisms. Considering the totality of the psychrotrophic microbiota of raw milk, Ntuli et al. (2016) identified *E. kobei* in 0.8% of the 479 isolates. This bacterium belongs to the family *Enterobacteriaceae*, making it possible that the raw milk in the present study was contaminated directly or indirectly by feces. In confined spaces, which

is the condition of the cows in this sample unit, udder contact with feces is frequent, and in these cases, increased attention should be paid to pre-dipping and elimination of the first milk jets.

Another enterobacterium that was found, *Y. enterocolitica*, is an important pathogen (Oliver et al., 2009), and it usually uses the swine as its reservoir. In fact, there are several pig farms in the region of the present study. The proteolytic activity on the plaques and the alkaline metalloprotease (*aprX*) production potential of this microorganism can compromise the quality of milk and dairy products, and its pathogenicity reaffirms the risk of consuming raw dairy products. In some regions of Brazil, the consumption of raw milk or of products made from raw milk is still frequent, as raw milk consumption is perceived to be safe. The study by Pierri et al. (2014) reports that 18.5% of the Brazilians interviewed regularly consume milk and raw products.

CONCLUSION

Despite the reduction of initial bacterial counts in raw milk to very low levels, the activity of heat-stable proteases, including alkaline metalloprotease, and of lipolytic enzymes originating from psychrotrophic bacteria is the limiting factor in maintaining the quality of fluid milk and its products.

Interestingly, the highest deteriorating activity of the psychrotrophs was verified at mesophilic temperature, and Gram-positive microorganisms predominate among the psychrotrophs with spoilage potential, *L. lactis* being the most prevalent species. In addition, infectious agents of mastitis and spore-forming organisms have also been identified among the deteriorating psychrotrophs, and these can also reduce the shelf-life of pasteurized milk. Therefore, it is necessary to develop sensitive and efficient tools to monitor and control their presence in raw milk.

ACKNOWLEDGEMENTS

The team of the present work thanks the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Regional Center for Excellence in Milk Technology - North Central for the financial support, the collaboration of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Soy Unit, specifically the researchers Renan Augusto Ribeiro, Jakeline Renata Marçon Delamuta and Mariangela Hungria da Cunha for training the team in Bionumerics software.

REFERENCES

- Andersson, I. and R. Öste. 1994. Nutritional quality of pasteurized milk. Vitamin B12, folate and ascorbic acid content during storage. *Int. Dairy J.* 4:161-172.
[https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)90066-3)
- Bach, H. J., A. Hartmann, M. Schloter, J. C. Munch. 2001. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J. Microbiol. Methods* 44:173–182.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00239-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00239-6)
- Baglinière, F., J. Jardin, F. Gaucheron, A. F. de Carvalho, M. C. D. Vanetti. 2017. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. *Int. Dairy J.* 68:38-45.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.012>
- Buehner, K. P., S. Anand and A. Garcia. 2014. Prevalence of thermotolerant bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97:6777-6784.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8342>

Bursová, Š., L. Necedová, D. Haruštiaková, B. Janštová. 2017. Growth potential of *Yersinia enterocolitica* in pasteurised cow's and goat's milk stored at 8° C and 24°C. *Food Control* 73:1415-1419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.006>

Cousin, M. A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Prot.* 45:172-207.

Das, B., A. P. Roy, S. Bhattacharjee, S. Chakraborty, C. Bhattacharjee. 2015. Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 121:244-252.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.024>

Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology.* 26: 297-302. <http://dx.doi.org/10.2307/1932409>

Dogan, B. and K. J. Boor. 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Envir. Microbiol.* 69:130-138. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.130-138.2003>

Edwards, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, E. C. Böttger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17:7843-7853.
<https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>

- Ercolini, D., F. Russo, I. Ferrocino, F. Villani. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol.* 26:228-231.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.09.005>
- Erich, S., B. Kuschel, T. Schwarz, J. Ewert, N. Böhmer, F. Niehaus, J. Eck, S. Lutz-Wahl, T. Stressler, L. Fischer. 2015. Novel high-performance metagenome β -galactosidases for lactose hydrolysis in the dairy industry. *J. Biotechnol.* 210:27-37.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.411>
- Fairbairn, D. J. and B. A. Law. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53:139-177.
<https://doi.org/10.1017/S0022029900024742>
- Felipe, V., C. A. Morgante, P. S. Somale, F. Varroni, M. L. Zingaretti, R. A. Bachetti, S. G. Correa, C. Porporatto. 2017. Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microb. Pathog.* 104:278-286.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.047>
- Gargouri, A., H. Hamed and A. ElFeki. 2013. Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *J. Food Sci.* 78:1405-1411. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12188>

- Gleeson, D., A. O'Connell and K. Jordan. 2013. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. *Ir. J. Agric. Food Res.* 52:217-227.
- Guimarães, F. F., M. P. Manzi, S. F. Joaquim, V. B. Richini-Pereira, H. Langoni. 2017. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. *J. Dairy Sci.* 100:726-730.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11700>
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41:95–98.
- Hantsis-Zacharov, E. and M. Halpern. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl. Envir. Microbiol.* 73:7162-7168. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00866-07>
- Holzappel, W. H., P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth, U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:365-373.
- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868-877. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.9.9.868>
- Huck, J. R., B. H. Hammond, S. C. Murphy, N. H. Woodcock, K. J. Boor. 2007. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *J. Dairy Sci.* 90:4872-4883. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0196>

- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Matéos, A., M. Guyard-Nicodème, F. Baglinière, J. Jardin, F. Gaucheron, A. Dary, G. Humbert, J. L. Gaillard. 2015. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *Int. Dairy J.* 49:78-88.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.008>
- Martins, M. L., E. F. de Araújo, H. C. Mantovani, C. A. Moraes, M. C. Vanetti. 2005. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 102:203-211.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.016>
- Martins, M. L., C. L. Pinto, R. B. Rocha, E. F. de Araujo, M. C. Vanetti. 2006. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 111:144-148.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.020>
- Matta, H., V. Punj and S. S. Kanwar. 1997. An immuno-dot blot assay for detection of thermostable protease from *Pseudomonas* sp. AFT-36 of dairy origin. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:300-302. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00228.x>

Mcphee J. D. and M. W. Griffiths. 2011. Psychrotrophic bacteria *Pseudomonas* spp. Pages 379-383 in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. W.F. John, ed. Academic Press, London, UK.

McAuley, C. M., T. K. Singh, J. F. Haro-Maza, R. Williams, R. Buckow, R. 2016. Microbiological and physicochemical stability of raw, pasteurised or pulsed electric field-treated milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 38: 365-373.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.030>

Normand, P., C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra, P. Simonet. 1996. ITS analysis of prokaryotes, Pages 1-12 in *Molecular microbial ecology manual*. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas, E. I. De Bruijn, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Ntuli, V., P. M. K. Njage and E. M. Buys. 2016. Characterization of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae in producer-distributor bulk milk. *J. Dairy Sci.* 99:9534-9549. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11403>

Oliveira, G. B. D., L. Favarin, R. H. Luchese, D. McIntosh. 2015. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. *Braz. J. Microbiol.* 46:313-321.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220130963>

Oliver, S. P., K. J. Boor, S. C. Murphy, S. E. Murinda. 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:793-806.
<http://doi.dx.org/10.1089/fpd.2009.0302>.

- Osborne, C. A., M. Galic, P. Sangwan, P. H. Janssen. 2005. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microb. Let.* 248:183-187.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.043>
- Pieri, F. A., M. Colombo, C. M. Merhi, V. A. Juliati, M. S. Ferreira, M. A. Nero, L. A. Nero. 2014. Risky consumption habits and safety of fluid milk available in retail sales outlets in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. *Foodborne Pathog. Dis.* 11:490-496.
<http://doi.dx.org/10.1089/fpd.2013.1712>.
- Pinto, C. L., L. V. Souza, V. A. Meloni, C. S. Batista, R. Silva, E. M. Martins, A. Cruz, M. L. Martins. 2017. Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *Int. J. Dairy Technol.* 70:1-7.
<http://doi.dx.org/0.1111/1471-0307.12339>
- Ranjard, L., F. Poly, J. C. Lata, C. Mougél, J. Thioulouse, S. Nazaret. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Envir. Microbiol.* 67:4479-4487. <http://doi.dx.org/10.1128/AEM.67.10.4479-4487.2001>
- Ribeiro Junior, J. C., R. Tamanini, L. C. C. da Silva, V. Beloti. 2015. Quality of milk produced by small and large dairy producers. *Semin-Cienc. Agrar.* 36:883-888.
<http://doi.dx.org/10.5433/1679-0359.2015v36n2p883>

Ribeiro Junior, J. C., R. Tamanini, B. F. Soares, A. M. de Oliveira, F. G. Silva, F. F. da Silva, N. A. Augusto, V. Beloti. 2016. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semin-Cienc. Agrar.* 37:3069-3078. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>

Saishu, N., K. Morimoto, H. Yamasato, H. Ozaki, T. Murase. 2015. Characterization of *Aerococcus viridans* isolated from milk samples from cows with mastitis and manure samples. *J. Vet. Med. Sci.* 77:1037-1042. <http://doi.dx.org/10.1292/jvms.15-0100>

Samarzija, D., S. Zamberlin and C. T. Pogaci. 2012. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo.* 62:77-95.

Scatamburlo, T. M., A. K. Yamazi, V. Q. Cavicchioli, F. A. Pieri, L. A. Nero. 2015. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *J. Dairy Sci.* 98:759-764. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8747>

Sørhaug, T. and L. Stepaniak. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Tech.* 8:35-41. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01006-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01006-6)

Sneath, P. H. and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA.

- Taponen, S., E. Liski, A. M. Heikkilä, S. Pyörälä. 2017. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 100:493-503. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11465>
- Vithanage, N. R., M. Dissanayake, G. Bolge, E. A. Palombo, T. R. Yeager, N. Datta. 2016. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *Int. Dairy J.* 57:80-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.042>
- von Neubeck, M., C. Baur, M. Krewinkel, M. Stoeckel, B. Kranz, T. Stressler, L. Fischer, J. Hinrichs, S. Scherer, M. Wenning. 2015. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int. J. Food Microbiol.* 211:57-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001>
- Xin, L., Z. Meng, L. Zhang, Y. Cui, X. Han, H. Yi. 2017. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. *Int. Dairy J.* 66:34-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.014>
- Zhang, S., H. Li, H. Uluko, L. Liu, X. Pang, J. Lv. 2015. Investigation of Protease Production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and Degradation on Milk Proteins. *J. Food Process. Preserv.* 39:2466-2472. <http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.12496>

Table 1. Primers and PCR cycling conditions.

Gene	Primers (5' – 3')	Size (pb)	PCR cycling conditions	Reference
<i>aprX</i>	TAYGGBTTC AAYTCCAAYAC VGCGATSGAMACRTTRCC	194	94°C-5m 30x (94°C-30s, 53°C-30s, 72°C-20s) 72°C-10m	Bach et al. (2001)
ITS region of 16-23S rRNA	CCGGGTTTCCCCATTCGG AAGGAGGTGATCCAGCCGCA		94°C-5m 40x (94°C-30s, 60°C-30s, 72°C-1min) 72°C-5m	Normand et al. (1996) Edwards et al. (1989)
<i>16S rRNA</i>	GAGTTTGATCMTGGCTCAG GGYTACCTTGTTACGACTT	1465	94°C-5m 35x (94°C-1m, 58°C-1m, 72°C- 1m) 72°C-10m	Osborne et al. (2005)

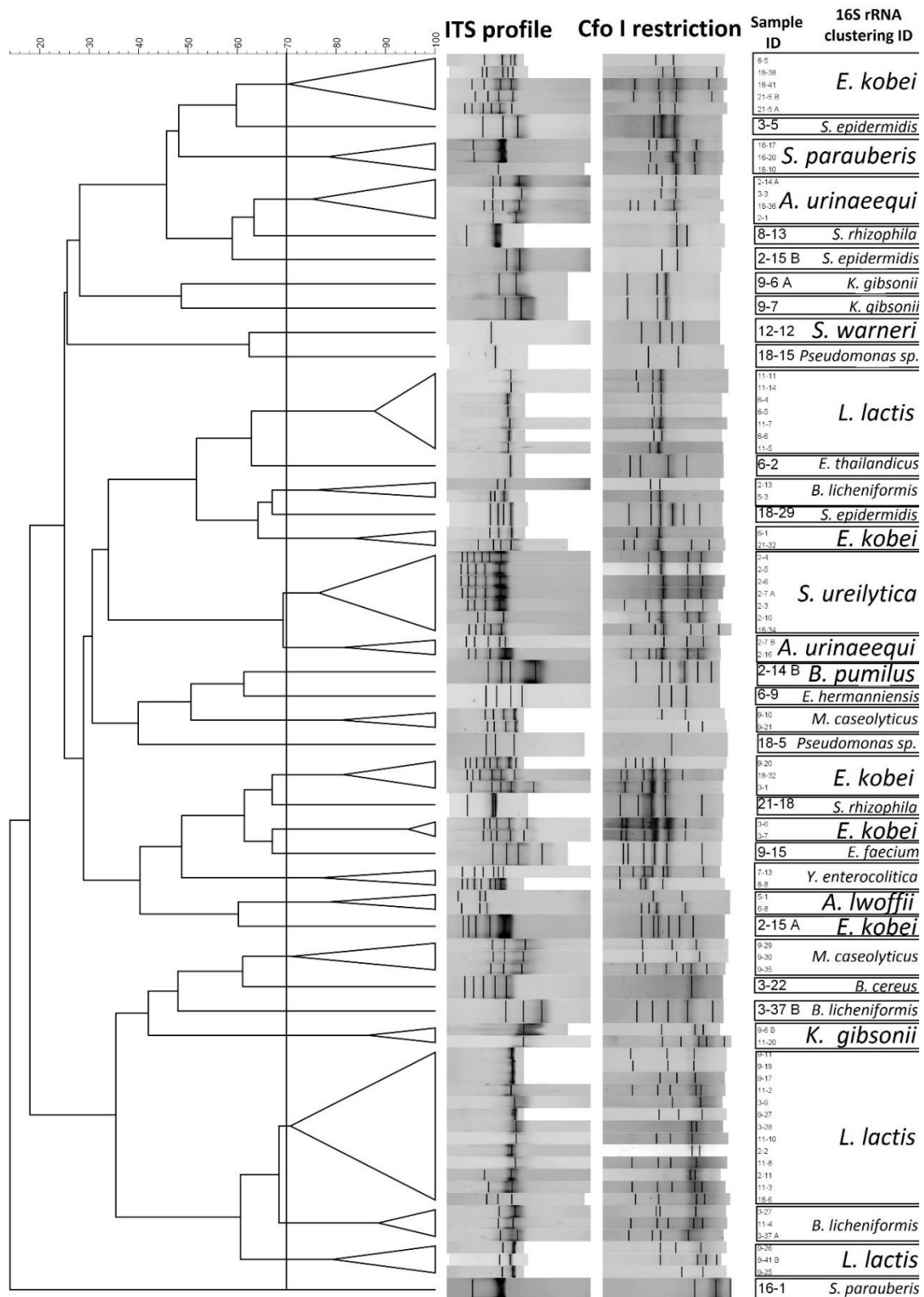


Figure 1. A phylogenetic similarity dendrogram of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from Brazilian raw milk, using the variables of the amplification profile of the Internal Transcript Spacer region 16-23S (ITS profile) and its restriction profile with the enzyme Cfo I, Dice coefficient and the unweighted pair group mean averages algorithm (UPGMA). The vertical line represents the minimum percentage of similarity (70%) used to determine the 36 clusters.

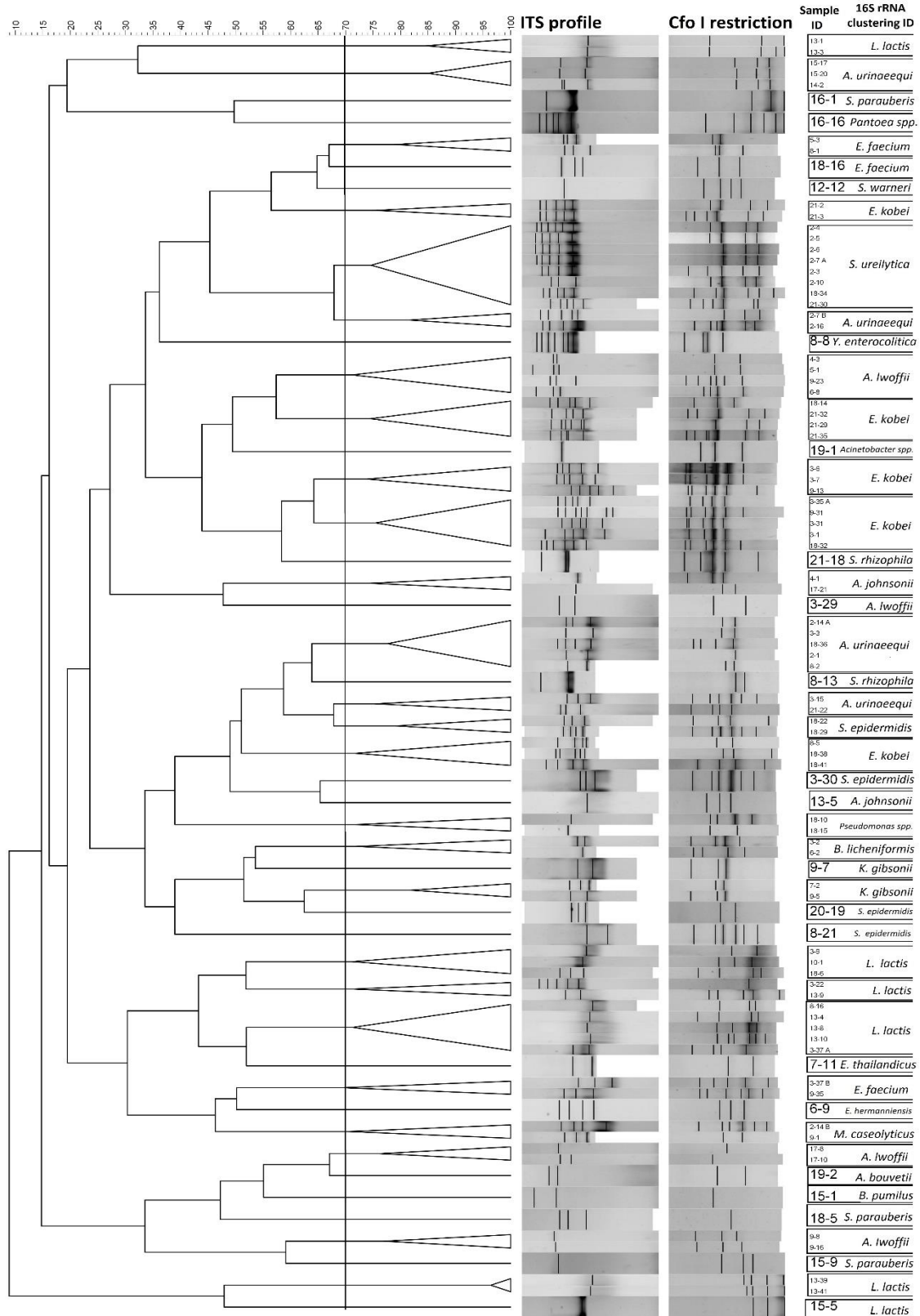


Figure 2. A phylogenetic similarity dendrogram of lipolytic psychrotrophic bacteria isolated from Brazilian raw milk prepared using the variables of the amplification profile of the Internal Transcript Spacer region 16-23S (ITS profile) and its restriction profile with the enzyme Cfo I, Dice coefficient and the unweighted pair group mean averages algorithm (UPGMA). The vertical line represents the minimum percentage of similarity (70%) used to determine the 47 clusters.

Table 2. Identification of spoilage microorganisms (n=141) among the total psychrotrophic microbiota (n=295) with proteolytic and lipolytic potential at 35°C and 7°C of the strains from high microbiological quality Brazilian refrigerated raw milk.

16S rRNA clustering identification	Total		Proteolytic		Lipolytic		Proteolytic and lipolytic	
			35°C/48 h	7°C/10 d	35°C/48 h	7°C/10 d	35°C/48 h	7°C/10 d
	n	(%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Lactococcus lactis</i>	35	24.5	20 (57.1)	18 (51.4)	11 (2.9)	6 (17.1)	4 (11.4)	3 (8.6)
<i>Enterobacter kobei</i>	22	15.4	5 (22.7)	2 (9.1)	9 (40.9)	7 (31.9)	8 (36.4)	3 (13.6)
<i>Aerococcus urinaeequi</i>	12	8.4		3 (25)	6 (50)	1 (8.3)	6 (50)	1 (8.3)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	9	6.3		2 (22.2)	7 (77.8)	8 (88.9)	2 (22.2)	
<i>Kurthia gibsonii</i>	8	5.6	4 (50)		3 (37.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	
<i>Serratia ureilytica</i>	8	5.6			1 (12.5)	1 (12.5)	7 (87.5)	6 (75)
<i>Bacillus licheniformis</i>	7	4.9	5 (71.4)		1 (14.3)	2 (28.6)	1 (14.3)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	4.9	2 (28.6)		4 (57.1)	2 (28.6)	1 (14.3)	1 (14.3)
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	6	5.6	4(66.6)	2 (33.3)	1 (16.7)		1 (16.7)	2 (33.3)
<i>Streptococcus parauberis</i>	5	3.5	2 (40)	2 (40)	1 (20)	1 (20)	2 (40)	1 (20)
<i>Enterococcus faecium</i>	4	2.8			3 (75)	3 (75)	1 (25)	1 (25)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	3	1.4			3 (100)	2 (66.7)		
<i>Enterococcus thailandicus</i>	2	1.4	1 (50)				1 (50)	
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	1.4					2 (100)	2 (100)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	2	1.4					2 (100)	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	1.4	1 (50)			1 (50)	1 (50)	
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	1	0.7			1 (100)			
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	0.7			1(100)	1 (100)		
<i>Bacillus cereus</i>	1	0.7	1 (100)			1 (100)		
<i>Bacillus pumilus</i>	1	0.7					1 (100)	
<i>Enterococcus hermanniensis</i>	1	0.7				1 (100)	1 (100)	
<i>Pantoea</i> spp.	1	0.7			1 (100)			
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0.7					1 (100)	1 (100)
Total	141	100	45 (31.9)	29 (20.6)	53 (37.6)	38 (27)	43 (30.5)	21 (14.9)

5 ARTIGO B**DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRO-ORGANISMOS TERMODÚRICOS
DETERIORANTES DO LEITE CRU REFRIGERADO DE ALTA QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA****GENETIC DIVERSITY OF THERMODURIC SPOILAGE MICROORGANISMS
FROM HIGH MICROBIOLOGICAL QUALITY RAW MILK****RESUMO**

A composição da microbiota do leite cru é tão importante quanto a quantificação. Bactérias que resistem aos tratamentos térmicos têm especial importância na deterioração do leite pós tratado e, portanto, na sua vida útil. O objetivo do presente trabalho foi quantificar os micro-organismos termodúricos em amostras de leite cru obtidas de propriedades tecnificadas e com contagem total de bactérias média de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL e identificar a diversidade dos isolados com capacidade proteolítica e/ou lipolítica. Os isolados que apresentaram atividade deteriorante foram agrupados por similaridade genética hierárquica em dendrogramas considerando a restrição do gene 16S rRNA e a identificação de representantes dos *clusters* foi realizada por similaridade filogenética. A contagem média de termodúricos foi $3,2 (\pm 4,7) \times 10^2$ UFC/mL, sendo que 44,2% dos isolados apresentaram atividade deteriorante. Quanto à diversidade, foram observados 8 gêneros de micro-organismos e o predomínio de bactérias formadoras de esporos (50%), sendo a espécie *Bacillus licheniformis* a mais frequente (34,1%) do total de isolados. Parte considerável dos micro-organismos termodúricos identificados apresentaram potencial deteriorante e capacidade de resistir a tratamentos térmicos nas formas vegetativas ou esporuladas, permanecendo viáveis no leite pasteurizado. Apesar de reduzir as contagens bacterianas iniciais do leite cru a níveis muito baixos, a atividade deteriorante de termodúricos, remanescentes do leite cru no pasteurizado, poderá ser o fator limitante na manutenção da qualidade. Dessa forma, o controle da contaminação do leite cru por esses micro-organismos pode ser fundamental para melhorar a qualidade e vida útil do leite pasteurizado.

Palavras-chave: lipólise, microbiota, pasteurização, proteólise

Formatado nas normas do Journal of Dairy Science

Revisão do Inglês pelo *American Journal Experts*: 72C3-FADC-7FDF-EB14-23C1

ABSTRACT

The composition of the raw milk microbiota it is as so important that your quantification. The bacterial forms that resist at heat-treatments are especially important in the deterioration of post-treated milk and therefore in its shelf life. The aim this work was to quantify the thermoduric microorganisms in raw milk samples of high technological dairy farms, with a mean of total bacterial count of 1.5×10^4 CFU/mL and identify the genetic diversity of isolates with proteolytic and/or lipolytic capacity. The isolates that shows spoilage potential were grouped by hierarchical genetic similarity in dendrograms considering the restriction of the 16S rRNA gene and the identification of representatives strains of the *clusters* was performed by phylogenetic similarity. The mean of thermoduric count was $3.2 (\pm 4.7) \times 10^2$ CFU/mL, and 44.2% of the isolates showed deteriorating activity. About diversity, eight genera were observed, with predominance of spore-forming bacteria (50%), with *Bacillus licheniformis* being the most frequent species (34.1%) of the total isolates. A considerable part of the thermoduric microorganisms identified shows spoilage potential and ability to resist at heat-treatments in vegetative or sporulated forms, remaining in pasteurized milk. Although reducing the initial bacterial counts of raw milk to very low levels, the deteriorating activity of thermoduric remnants of raw milk will be the limiting factor in maintaining quality. Thus, the control of contamination of raw milk by these microorganisms may be fundamental to improve the quality and shelf life of pasteurized milk.

Key words: lipolysis, microbiota, pasteurization, proteolysis

INTRODUÇÃO

A pasteurização é um processo eficiente para eliminar micro-organismos patogênicos, dessa forma, confere segurança microbiológica para consumo do leite pasteurizado e reduz a quantidade de micro-organismos deteriorantes (Sørhaug and Stepaniak, 1997; Lewis, 2003; Knight et al., 2004). No entanto, o processamento térmico do leite cru não é suficiente para eliminação de todos os micro-organismos capazes causar a sua deterioração. Micro-organismos termodúricos resistem ao processo de pasteurização do leite e podem utilizar constituintes como proteínas e gordura como fontes de nutrientes, causando alterações sensoriais e redução da vida útil do produto (Hull et al., 1992; Huck et al., 2007).

Os micro-organismos termodúricos influenciam diretamente a vida útil do leite pasteurizado, juntamente com a atividade enzimática de proteases e lipases extracelulares produzidas por micro-organismos deteriorantes, principalmente psicrotróficos no leite cru (Fairbairn and Law, 1986; Sørhaug and Stepaniak, 1997; Marchand et al., 2008). Também ocorre a deterioração do leite pela ação de proteases endógenas como a plasmina (Bastian; Brown, 1996; Murphy et al., 2016), tipo de embalagem (Petrus et al., 2010) e contaminantes adquiridos após a pasteurização.

Micro-organismos esporulados, principalmente os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, são frequentemente descritos como os principais responsáveis pela redução da vida útil do leite pasteurizado (Scheldemann et al., 2004; Huck et al., 2007; Ranieri et al., 2009; 2012). No entanto, outros micro-organismos não esporulados podem resistir à pasteurização (Buehner et al., 2014; Ribeiro Júnior et al., 2017).

A vida útil do leite pasteurizado brasileiro está limitada a poucos dias, principalmente em decorrência da má qualidade microbiológica do leite cru e deficiências no processamento e embalagem. Micro-organismos capazes de resistir ao processo de pasteurização nas formas vegetativa e esporulada são importantes para as indústrias lácteas no contexto da vida útil do leite pasteurizado. Porém, pouco se sabe sobre a identidade e o potencial proteolítico e lipolítico dos termodúricos no leite cru brasileiro, o que dificulta determinar a origem da contaminação por esses micro-organismos nas propriedades rurais, e controlar essa microbiota no leite cru.

Algumas bacias leiteiras brasileiras, entretanto, são referência em qualidade e produtividade do leite. A região do município de Castro, Paraná, é um exemplo. São propriedades que produzem grandes volumes diários, com alto grau de tecnificação e práticas de higiene implementadas, possuem animais com grande aptidão para produção leiteira e

qualidade microbiológica do leite de acordo com padrões internacionais ($< 10^5$ UFC/mL), apresentando potencial de produção de leite pasteurizado de longa vida útil.

A partir da identificação dos micro-organismos termodúricos proteolíticos e lipolíticos, pode-se determinar sua origem permitindo estabelecer estratégias específicas para o controle dessa microbiota no leite cru. Consequentemente, será possível aumentar a vida útil do leite pasteurizado, preservar a integridade de seus constituintes, aumentar o rendimento industrial na produção dos derivados lácteos e reduzir problemas tecnológicos no leite UHT e derivados.

O objetivo do presente trabalho foi quantificar os micro-organismos termodúricos em leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica produzido na região sul do Brasil, avaliar o potencial deteriorante desses micro-organismos, sua diversidade filogenética e identidade visando em etapa posterior determinar a origem da contaminação do leite cru nas fazendas brasileiras e o desenvolvimento de práticas de controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 20 amostras de leite cru refrigerado coletadas na bacia leiteira da região de Castro, Paraná, Brasil. A descrição das propriedades está previamente relatada por Ribeiro Júnior et al. (2015) e 95% dos produtores da região apresentam contagens totais de bactérias $< 10^5$ UFC/mL, com média de $1,5 (\pm 3,4) \times 10^4$ UFC/mL. As amostras de leite foram coletadas assepticamente nos tanques de refrigeração e encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina, onde foram imediatamente processadas.

A contagem de termodúricos foi realizada após tratamento térmico de 5 mL da amostra de leite em temperatura que simula a pasteurização ($62,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 30 minutos) e imediata refrigeração até 10°C controlada em tubo em paralelo, com termômetro, de acordo com Frank e Yousef (2004). Após o tratamento, foram realizadas diluições decimais seriadas das amostras até 10^{-3} e semeou-se duplicatas em superfície (0,1 mL) de ágar padrão para contagem. As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h.

Todas as colônias isoladas obtidas nas placas das diluições utilizadas para a contagem foram repicadas em ágar leite (Acumedia, Baltimore, USA) suplementado a 10% com solução de leite em pó reconstituído (10%) e em ágar tributirina (Himedia, Mumbai, India) suplementado a 1% com tributirina (Himedia) para verificação da atividade proteolítica e

lipolítica, respectivamente (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 48 horas.

Os isolados que apresentaram atividade deteriorante foram repicados em caldo cérebro coração para extração de DNA genômico por fervura (Ribeiro Júnior et al., 2016a). Os produtos de extração foram submetidos à amplificação parcial do gene 16S rRNA utilizando os primers 27f (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492r (5'- GGYTACCTTGTTACGACTT – 3') (Osborne et al., 2005), com produto de 1465 pb. As reações foram realizadas com quantidades finais de 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada base nitrogenada, 1X buffer, 75 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 20 pmol.L⁻¹ de cada primer e 2.5 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) com volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e, 1 ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os amplicons do gene 16S rRNA foram submetidos à técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) para agrupamento genético hierárquico a partir dos perfis de restrição com as enzimas Cfo I (Promega, Madison, USA), Taq I (Ludwig Biotech, Santa Maria, Brasil), Rsa I (Invitrogen) e Hae III (Invitrogen), utilizando protocolos descritos pelos fabricantes.

Após as reações de restrição, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% por 60 minutos a 70V. Os géis foram corados em brometo de etídio (0,2 mg/L) e fotodocumentados. As imagens de cada perfil de restrição foram analisadas pelo software Bionumerics v. 1.50 (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica). Foram utilizados o coeficiente de similaridade de Dice (Dice, 1945) e algoritmo *Unweighted Pair Group Mean Averages* (UPGMA) (Sneath; Sokal, 1973). Para determinação dos *clusters*, foi utilizado o mínimo de 50% de similaridade filogenética.

Um isolado representativo de cada cluster foi selecionado aleatoriamente para nova reação de PCR do gene 16S rRNA, submetida à purificação (PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen) e quantificação (Qubit® dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen) para sequenciamento de DNA pelo método de Sanger (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) em ambas as direções.

A qualidade das sequências foi avaliada pelo software BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) e as sequências consensuais foram geradas pelo CAP 3 (Huang; Madan, 1999). A identificação preliminar em nível de gênero foi realizada pelo Blast tool do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Identificados os gêneros, as sequências foram alinhadas

individualmente pelo Clustal W com as sequências tipo representativas de cada espécie do gênero, disponíveis no *Ribosomal Database Project* (RDP), para identificação das espécies por similaridade genética determinada método Neighbor joining e modelo Tamura-Nei utilizando-se suporte bootstrap para 1000 réplicas no software MEGA v. 7.0 (Kumar et al., 2016).

RESULTADOS

As contagens de termodúricos variaram entre 5 UFC/mL e 2×10^3 UFC/mL, com média de $3,2 (\pm 4,7) \times 10^2$ UFC/mL, para as 20 amostras de leite cru avaliadas. A partir das placas utilizadas para as contagens, foram obtidas 310 colônias, das quais 132 (42,6%) apresentaram atividade deteriorante. Dessas, 43 (32,6%) foram simultaneamente proteolíticas e lipolíticas, 41 (31%) exclusivamente proteolíticas e 48 (36,4%) apenas lipolíticas (Tabela 1).

Esses 132 isolados potencialmente deteriorantes foram agrupados por RFLP conforme seu potencial proteolítico ou lipolítico em dois dendogramas. Nos dendogramas dos micro-organismos termodúricos proteolíticos (Figura 1) e lipolíticos (Figura 2), foram determinados 41 e 38 *clusters*, respectivamente.

Após o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de um representante de cada cluster, a identificação ao nível de espécie por Clustal W e análise filogenética foi possível em 94,7% dos 132 isolados de termodúricos. Em sete isolados foi possível a identificação somente em nível de gênero, sendo seis *Bacillus* spp. e um *Kocuria* spp.. A composição da microbiota termodúrica deteriorante do leite cru avaliado está detalhada na Tabela 1.

Quanto à diversidade, observou-se entre os termodúricos deteriorantes do leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica, isolados com o mesmo perfil polimórfico de oito gêneros (*Bacillus*, *Brachybacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Paenibacillus* e *Macrococcus*), todos micro-organismos Gram positivos e com potencial termodúrico conhecido. Houve predominância das espécies *Bacillus licheniformis*, *Brachybacterium nesterenkovi*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*.

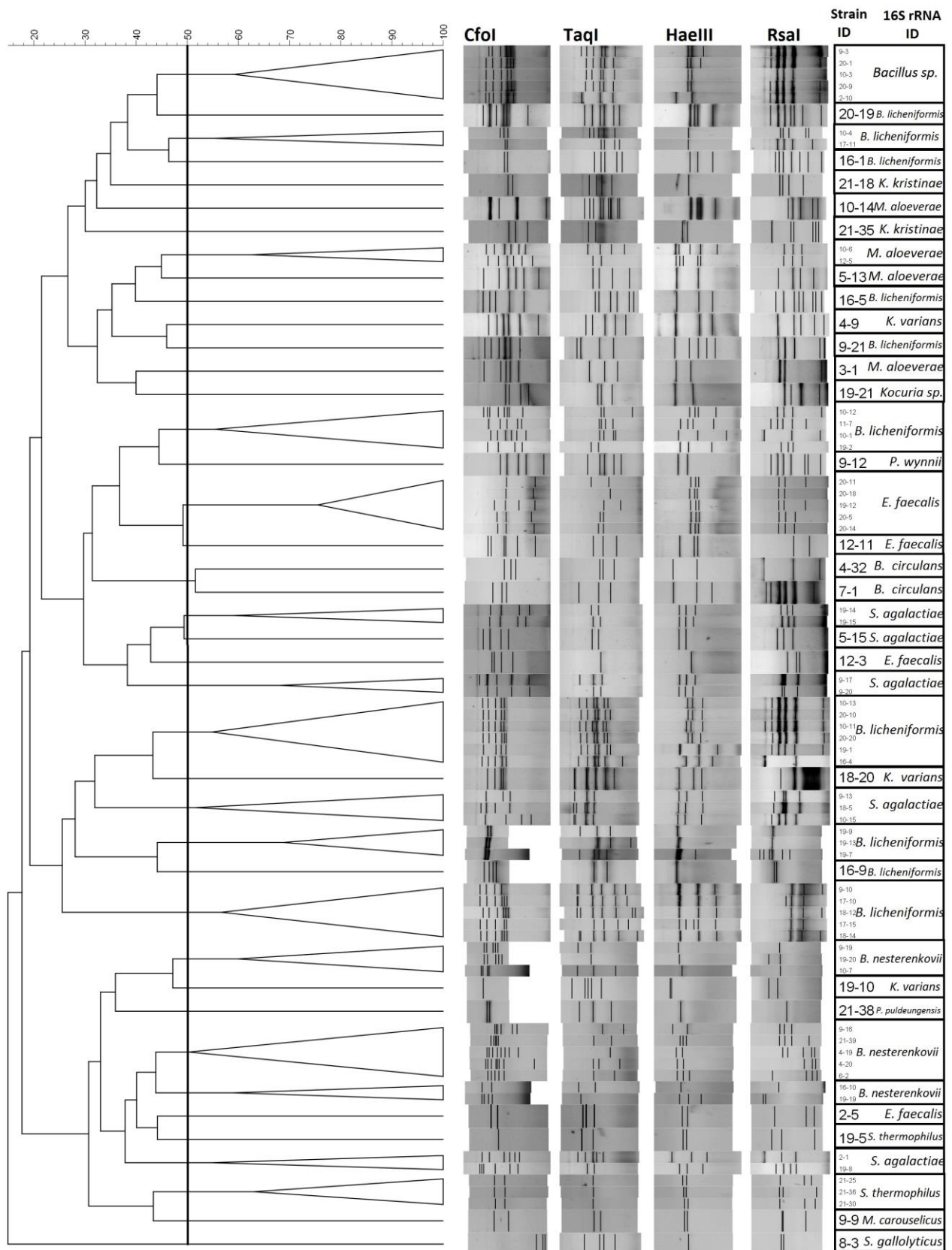


Figura 1. Dendrograma de similaridade filogenética de bactérias termofílicas proteolíticas isoladas do leite cru brasileiro, elaborado utilizando-se RFLP do gene 16S rRNA com as enzimas CfoI, TaqI, HaeIII e RsaI, coeficiente de Dice e algoritmo *Unweighted Pair Group Mean Averages* (UPGMA). A linha vertical representa o percentual mínimo de similaridade (50%) utilizado para determinação dos 41 clusters.

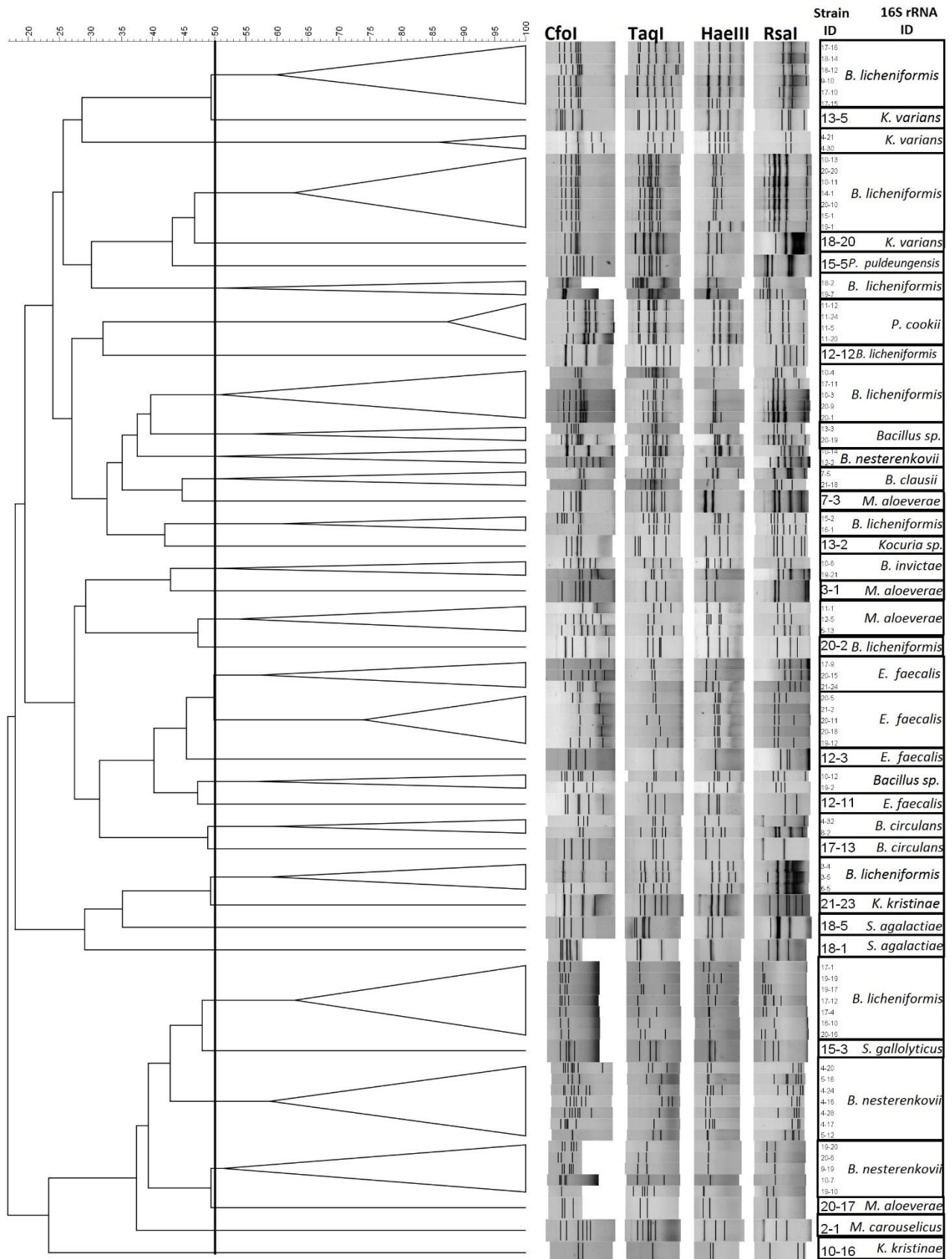


Figura 2. Dendrograma de similaridade filogenética de bactérias termofílicas lipolíticas isoladas do leite cru brasileiro, elaborado utilizando-se RFLP do gene 16S rRNA com as enzimas CfoI, TaqI, HaeIII e RsaI, coeficiente de Dice e algoritmo *Unweighted Pair Group Mean Averages* (UPGMA). A linha vertical representa o percentual mínimo de similaridade (50%) utilizado para determinação dos 38 clusters.

Tabela 1. Identificação, proporcionalidade e potencial deteriorante de bactérias termodúricas isoladas do leite cru refrigerado brasileiro de alta qualidade microbiológica.

Identificação	Total	Proteolíticos e lipolíticos	Proteolíticos	Lipolíticos
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Bacillus licheniformis</i>	45 (34,1)	16 (35,6)	11 (24,4)	18 (40)
<i>Brachybacterium nesterenkovii</i>	19 (14,4)	5 (26,3)	5 (26,3)	9 (47,4)
<i>Enterococcus faecalis</i>	12 (9,1)	7 (58,3)	2 (16,7)	3 (25)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	11 (8,3)	1 (9,1)	9 (81,8)	1 (9,1)
<i>Bacillus</i> spp.	6 (4,55)	3 (50)	2 (33,3)	1 (16,7)
<i>Micrococcus aloeverae</i>	6 (4,55)	5 (83,3)		1 (16,7)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6 (4,55)		6 (100)	
<i>Kocuria varians</i>	5 (3,9)	2 (40)	1 (20)	2 (40)
<i>Bacillus circulans</i>	4 (3,0)	1 (25)	1 (25)	2 (50)
<i>Paenibacillus cookii</i>	4 (3,0)			4 (100)
<i>Kocuria kristinae</i>	3 (2,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Bacillus clausii</i>	2 (1,5)			2 (100)
<i>Bacillus invictae</i>	2 (1,5)			2 (100)
<i>Paenibacillus puldeungensis</i>	2 (1,5)		1 (50)	1 (50)
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2 (1,5)		1 (50)	1 (50)
<i>Kocuria</i> spp.	1 (0,75)	1 (100)		
<i>Macrococcus carouzelicus</i>	1 (0,75)	1 (100)		
<i>Paenibacillus wynnii</i>	1 (0,75)		1 (100)	
TOTAL	132 (100)	43 (32,6)	41 (31)	48 (36,4)

DISCUSSÃO

As contagens de termodúricos observadas pelo presente trabalho foram próximas aos resultados de Buehner et al. (2014) que encontraram média de 2,76 log UFC/mL nas 10 amostras de leite cru refrigerado estudadas no estado de Dakota do Sul, Estados Unidos, onde a vida útil do leite pasteurizado passa de 20 dias. Dessa forma, considerando somente as contagens de termodúricos, é esperado que o leite cru refrigerado dessa unidade amostral, após a pasteurização, também apresente vida útil semelhante ao praticado nos Estados Unidos. Essa diferença entre as contagens pode estar associada às boas condições higiênic-

sanitárias de obtenção do leite cru nas propriedades avaliadas pelo presente trabalho, com baixa contaminação ambiental.

A média da contagem total de bactérias (CBT) na presente amostragem foi de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL (Ribeiro Júnior et al., 2015), o que reafirma a boa qualidade microbiológica dessas amostras de leite cru. Considerando essa média de CBT, a contagem média de termodúricos correspondeu a 2,1% da totalidade de micro-organismos presentes, sendo que, 42,6% dessa microbiota apresenta potencial deteriorante, podendo comprometer a qualidade do leite pasteurizado.

Algumas indústrias de laticínios, principalmente da Nova Zelândia, utilizam a contagem de termodúricos de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL do leite cru como limite em programas de pagamento por qualidade do leite. Somente uma amostra (5%) do presente trabalho apresentou contagem superior ao padrão neozelandês, demonstrando a qualidade diferenciada do leite produzido na região estudada.

A legislação brasileira não estabelece padrão para contagem de termodúricos no leite cru refrigerado. Para o leite pasteurizado, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina na Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2011) a contagem total de bactérias de até $8,0 \times 10^4$ UFC/mL, na qual incluem os micro-organismos termodúricos e os contaminantes pós-pasteurização, como coliformes. Desconsiderando a possível recontaminação do leite pasteurizado, a totalidade das amostras avaliadas do pelo presente trabalho atenderiam ao padrão brasileiro.

Algumas indústrias recorrem ao aumento da temperatura de pasteurização como forma de aumentar a vida útil (Martin et al., 2011). No entanto, Ranieri et al. (2009) verificaram que a contagem total de bactérias aumentou de 50 UFC/mL, quando o leite foi pasteurizado a 72,9°C, para 153 UFC/mL quando a temperatura de pasteurização foi de 79,9°C, concluindo que incremento na temperatura de pasteurização determina maiores contagens totais de bactérias no leite pasteurizado, justificado pelo aumento da taxa de germinação de esporos de *Bacillus*, *Paenibacillus* e outros esporulados.

Dessa forma, a utilização da temperatura de 72 a 75°C por 10 a 15 segundos de pasteurização do leite, como determina a legislação brasileira (Brasil, 2011) e a maioria dos países em todo o mundo, confere seguridade para o consumo do leite pasteurizado e tem menor impacto na germinação de micro-organismos esporulados, o que pode vir a favorecer menores contagens bacterianas no leite pasteurizado e, conseqüentemente, sua maior vida útil.

Foi observado na presente amostragem, o predomínio de *B. licheniformis* dentre os termodúricos deteriorantes, sendo a maioria dos isolados (40%) produtores lipases, e 35,6%

com atividade proteolítica e lipolítica, simultaneamente. Essa espécie é formadora de esporos e a mais frequente entre as bactérias oriundas da germinação de esporos no leite em diversos países (Scheldeman et al., 2004; Coorevits et al., 2008; Reginensi et al., 2011; Yuan et al., 2012; Buehner et al., 2014). Podem ainda se multiplicar em temperaturas de refrigeração (Doyle et al., 2015; Murphy et al., 2016), o que permite que se desenvolvam e perdurem por toda a cadeia do leite. O fato de serem esporulados, torna ainda mais preocupante sua presença, uma vez que a germinação desses esporos é determinante para a vida útil do leite pasteurizado a partir de 14 dias (Durak et al., 2006; Huck et al., 2007)

Outros micro-organismos geralmente descritos como formadores de esporos foram descritos na microbiota termodúrica no presente trabalho, como *Bacillus circulans* e *Paenibacillus* spp.. A primeira descrição de isolamento de micro-organismos do gênero *Paenibacillus* no leite cru refrigerado brasileiro foi recentemente relatada pela equipe do presente trabalho (Ribeiro Júnior et al., 2016b).

Shaheen et al. (2010) relataram que 32% da microbiota termodúrica do leite é constituída de bactérias formadoras de esporos. Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* representam 50% (66 isolados) dos micro-organismos termodúricos deteriorantes isolados pelo presente trabalho. Essa variação em relação ao estudo Shaheen et al. (2010) pode ser atribuída a causas ambientais, principalmente, uma vez que os esporos de bactérias podem contaminar o leite pelo solo (Vissers et al., 2007), silagem (Hull et al., 1992; Buehner et al., 2014), água (Torp et al., 2001), fezes (Hull et al., 1992), tetos (Christiansson et al., 1999) e equipamentos de ordenha (te Giffel et al., 2002).

Vale ressaltar que o presente trabalho avaliou a microbiota termodúrica mesófila. Alguns micro-organismos, inclusive esporulados, podem ser termodúricos, deteriorantes e se multiplicarem em temperaturas de refrigeração. São, portanto, termodúricos psicrotróficos. Martin et al. (2011) relataram a capacidade de multiplicação de *Paenibacillus* em temperaturas de refrigeração, assim como o estudo de Ribeiro Júnior et al. (2017) que verificaram a atividade proteolítica de *B. pumilus* (Coorevits et al., 2008; Reginensi et al., 2011; Buehner et al., 2014), isolada do leite cru brasileiro após a pasteurização e incubação a 7°C por 10 dias.

Assim, considerando que os micro-organismos esporulados encontrados pelo presente estudo também podem ser psicrotróficos, que a legislação brasileira permite o armazenamento do leite nas propriedades rurais por até 48 horas sob refrigeração (Brasil, 2011) e como as amostras do presente trabalho foram coletadas logo após a ordenha, é possível que as contagens de termodúricos fossem maiores caso a coleta das amostras de leite tivesse sido realizada após 48h de conservação.

Este estudo verificou o predomínio de micro-organismos esporulados após o tratamento do leite a 62,8°C por 30 minutos. Conforme discutido anteriormente, o incremento da temperatura de pasteurização ainda estimula a germinação de esporos de *Bacillus* e *Paenibacillus* (Ranieri et al., 2009), tanto que as metodologias de contagem e isolamento de esporos aeróbios no leite recomendam o tratamento das amostras a 80°C por 12 minutos (Frank e Youssef, 2004) para eliminar as formas vegetativas e estimular a sua germinação (Murphy et al., 2016).

Considerando, portanto, a predominância de esporulados nas amostras avaliadas pelo presente trabalho e o que foi relatado por Ranieri et al. (2009), é possível que mesmo as formas vegetativas dos micro-organismos esporulados resistam ao tratamento do leite a 62,8°C por 30 minutos ou esse tratamento pode ser suficiente para estimular a germinação dos esporos desses micro-organismos presentes no leite cru.

Brachybacterium nesterenkovii foi a segunda espécie mais frequente isolada entre os termodúricos pelo presente trabalho (14,4%), com predomínio de cepas com atividade lipolítica (47,4%) (Tabela 1). Não foram encontrados relatos anteriores sobre sua capacidade termodúrica e atividade deteriorante no leite. O estudo de Rathod e Pathak (2016) relata apenas a produção de protease alcalina por uma cepa de *Brachybacterium* não isolada do leite.

Tendo em vista a capacidade psicrotrófica (Lafarge et al., 2004), potencial proteolítico (Rathod; Pathak, 2016) a capacidade termodúrica e deteriorante de *B. nesterenkovii* verificada pelo presente trabalho, micro-organismos desse gênero ganham importância como deteriorantes do leite, podendo influenciar negativamente sua qualidade, vida útil e potencial tecnológico.

Enterococcus e *Streptococcus* foram outros dois gêneros que predominaram entre os termodúricos no presente trabalho. O estudo de Delgado et al. (2013) também verificou a presença de *S. thermophilus*, *E. faecium*, *Kocuria* spp., *Streptococcus* spp. e outras bactérias ácido lácticas (BAL) no leite pasteurizado. McAuley et al. (2015) relatam que *Enterococcus* estão presentes em 96% das amostras de leite cru e *E. faecalis* como a espécie mais frequente (74,3% dos 909 isolados) e conhecidamente termodúrica (McAuley et al., 2012). Parte das BAL autóctones do leite cru pode resistir à pasteurização e pode ter ação sobre as proteínas e gordura do leite, desejável em muitos processos tecnológicos nas indústrias na produção de derivados lácteos (Giraffa, 2003; Ortolani et al., 2010) ou indesejável se excessiva no leite fluido, tornando-se deteriorante.

Espécies de *Micrococcus* e *Streptococcus* são frequentemente isoladas do leite pasteurizado (Hull et al., 1992) e os casos de mastites no rebanho podem ser a origem da

contaminação do leite por esses micro-organismos (Taponen et al., 2017), de difícil controle em rebanhos de alta produção, caso das propriedades estudadas no presente trabalho.

Flint et al. (1999) também relatam o potencial termodúrico de *S. thermophilus* e a sua capacidade de formação de biofilmes. Isso, de acordo com os autores, pode comprometer a qualidade do leite pasteurizado. Seis (100%) das cepas dessa espécie identificadas pelo presente trabalho, isoladas de 3 amostras de leite distintas, apresentaram atividade proteolítica. Além disso, micro-organismos termofílicos formadores de biofilmes podem aderir às placas trocadoras de calor dos equipamentos dos laticínios e comprometer a qualidade do leite processado (Murphy et al., 2016). Tamanha sua importância nos equipamentos dos laticínios, o estudo de Knight, Nicolb e McMeekin (2004) propõe alterações nos ciclos de temperatura de processamento para obtenção de leite pasteurizado isento de *S. thermophilus*.

Considerando a resistência desses micro-organismos à pasteurização e a alta porcentagem de esporulados entre eles, a melhor estratégia para aumentar a vida útil do leite pasteurizado brasileiro e o seu potencial tecnológico é evitar a contaminação por micro-organismos termodúricos durante a obtenção, armazenamento e transporte do leite cru. Portanto, são necessários outros estudos no sentido de buscar as fontes de contaminação do leite por esses micro-organismos em condições de produção brasileiras, e estabelecer estratégias para evitar a contaminação do leite cru, aumentando a qualidade do leite pasteurizado, sua vida útil, potencial e rendimento industrial e, conseqüentemente, sua competitividade internacional.

CONCLUSÃO

Apesar dos termodúricos representarem um baixo percentual da microbiota total das amostras de leite avaliadas, o impacto desses micro-organismos na qualidade do leite pasteurizado deve ser considerado pelo seu potencial deteriorante. Mesmo sob condições sanitárias controladas de obtenção, foi observada grande diversidade de gêneros de termodúricos, principalmente espécies formadoras de esporos, resistentes à tratamentos térmicos mais intensos que a pasteurização. Dessa forma, estabelecer ferramentas de controle da contaminação do leite cru por esses micro-organismos pode ser a melhor alternativa para reduzir os problemas em decorrência da ação deteriorante microbiana.

REFERÊNCIAS

- Barrett, N. E., A. S. Grandison and M. J. Lewis. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *J. Dairy Res.* 66:73–80.
- Bastian, E. D., and R. J. Brown. 1996. Plasmin in milk and dairy products: An update. *Int. Dairy J.* 6:435–457. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00021-6)
- Brasil. 2011. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. DIPOA. Normative Instruction No. 62 of 29 Dec. 2011. *Diário Oficial da União*. Brasília.
- Buehner, K. P., S. Anand and A. Garcia. 2014. Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97:6777-6784. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8342>
- Christiansson, A., J. Bertilsson and B. Svensson. 1999. *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.* 82:305–314. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75237-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75237-9)
- Coorevits, A., V. Jonghe, J. Vandroemme, R. Reekmans, J. Heyrman, W. Messens, P. Vos, M. Heyndrickx. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Syst. Appl. Microbiol.* 31:126-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2008.03.002>
- Delgado, S., C. T. Rachid, E. Fernández, T. Rychlik, A. Alegría, R. S. Peixoto, B. Mayo. 2013. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiol.* 36:103-111. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.015>
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology.* 26:297-302. <http://dx.doi.org/10.2307/1932409>
- Doyle, C. J., D. Gleeson, K. Jordan, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, P. D. Cotter. 2015. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *Int. J. Food. Microbiol.* 197:77-87.

- Durak M. Z., H. I. Fromm, J. R. Huck, R. N. Zadoks, K. J. Boor. 2006. Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. isolated from fluid milk products. *J. Food Sci.* 71:50-56. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08907.x>
- Fairbairn, D. J., and B. A. Law. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53:139-177. <https://doi.org/10.1017/S0022029900024742>
- Flint, S. H., H. van der Elzen, J. D. Brooks, P. J. Bremer. 1999. Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonizing stainless steel. *Int. Dairy J.* 9:429– 436. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00048-5)
- Frank, J. F., and A. E. Yousef. 2004. Tests for groups of microorganisms. Pages 281–292 in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th ed. H. M. Wehr and J. F. Frank, ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food. Microbiol.* 88:215–222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41:95–98.
- Hantsis-Zacharov, E., and M. Halpern. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7162-7168. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00866-07>
- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868-877. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.9.9.868>
- Huck, J.R., B. H. Hammond, S. C. Murphy, N. H. Woodcock, K. J. Boor. 2007. Tracking spore-forming bacterial contaminants in milk fluid milk-processing systems. *J. Dairy Sci.* 90:4872-4883. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0196>

- Hull, R. R., S. Toyne, I. N. Haynes, F. L. Lehmann. 1992. Thermotolerant bacteria: A re-emerging problem in cheesemaking. *Aust. J. Dairy Technol.* 47:91–94.
- Knight, G. C., R. S. Nicol, and T. A. McMeekin. 2004. Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. *Int. J. Food. Microbiol.* 93:305-318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.11.013>
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lafarge, V., J. C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J. Y. Leveau, A. Gruss, A. Delacroix-Buchet. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5644-5650. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004>
- Lewis, M. J. 2003. Improvements in the pasteurisation and sterilisation of milk. In: Smit, G. (Ed.), *Dairy Processing, Improving Quality*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 81–103.
- Marchand, S., K. Coudijzer, M. Heyndrickx, K. Dewettinck, J. De Block. 2008. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. *Int. Dairy J.* 18:514-519. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.007>
- Martin, N. H., M. L. Ranieri, S. C. Murphy, R. D. Ralyea, M. Wiedmann, K. J. Boor, 2011. Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf-life performance of commercially pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* 94:1211-1222. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3915>
- McAuley, C. M., K. S. Gobius, M. L. Britz, H. M. Craven. 2012. Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *Int. J. Food. Microbiol.* 154:162-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.033>

- McAuley, C. M., M. L. Britz, M. L., K. S. Gobius, H. M. Craven. 2015. Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *J. Dairy Sci.* 98:8348-8358. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9335>
- Murphy, S. C., N. H. Martin, D. M. Barbano, M. Wiedmann. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. *J. Dairy Sci.* 99:10128-10149. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172>
- Ortolani, M. B. T., A. K. Yamazi, P. M. Moraes, G. N. Viçosa, L. A. Nero. 2010. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:175-180. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0390>
- Osborne, C. A., M. Galic, P. Sangwan, P. H. Janssen. 2005. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microb. Let.* 248:183-187. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.043>
- Petrus, R. R., C. G. Loiola and C. A. F. Oliveira. 2010. Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch. *J. Food Sci.* 75:36-40. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01443.x>
- Ranieri, M. L., J. R. Huck, M. Sonnen, D. M. Barbano, K. J. Boor. 2009. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* 92:4823-4832. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2144>
- Ranieri M. L., R. A. Ivy, W. R. Mitchell, E. Call, S. N. Masiello, M. Wiedmann, K. J. Boor. 2012. Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5855-5863. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01361-12>

- Rathod, M. G., and A. P. Pathak. 2016. Optimized production, characterization and application of alkaline proteases from taxonomically assessed microbial isolates from Lonar soda lake, India. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7:164-173. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.002>
- Reginensi, S.M., M. J. González, J. A. Olivera, M. Sosa, P. Juliano, J. Bermúdez. 2011. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *Int. J. Food Microbiol.* 148:36-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.020>
- Ribeiro Junior, J. C., R. Tamanini, L. C. C. da Silva, V. Beloti. 2015. Quality of milk produced by small and large dairy producers. *Semin-Cienc. Agrar.* 36:883-888. <http://doi.dx.org/10.5433/1679-0359.2015v36n2p883>
- Ribeiro Junior, J. C., R. Tamanini, B. F. Soares, A. M. de Oliveira, F. G. Silva, F. F. da Silva, N. A. Augusto, V. Beloti. 2016a. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semin-Cienc. Agrar.* 37:3069-3078. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>
- Ribeiro Júnior, J. C., B. K. de Alcântara, V. Beloti. 2016b. Spoilage potential of *Paenibacillus* sp. in Brazilian raw milk. *Cienc Rural.* 46:637-640. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150810>
- Ribeiro Júnior, J. C., V. Beloti, F. P. Massi, M. H. P. Fungaro. 2017. Thermotolerant psychrotrophic proteolytic microbiota from refrigerated raw milk. *Semin-Cienc. Agrar.* 38:267-272. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n1p267>
- Scheldeman, P., K. Goossens, M. Rodriguez-Diaz, A. Pil, J. Goris, L. Herman, P. Vos, N. A. Logan, M. Heyndrickx. 2004. *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:885-891. <http://dx.doi.org/10.1099/ijss.0.02822-0>

- Shaheen, R., B. Svensson, M. A. Andersson, A. Christiansson, M. Salkinoja-Salonen. 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol.* 27:347-355. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.004>
- Sneath, P. H. and R. R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification.* W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA.
- Sørhaug, T., and L. Stepaniak. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 8:35-41. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01006-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01006-6)
- Taponen, S., E. Liski, A. M. Heikkilä, S. Pyörälä. 2017. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 100:493-503. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11465>
- te Giffel, M. C., A. Wagendorp, A. Herrewegh, F. Driehuis. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:625–630. <https://doi.org/10.1023/A:1020578110353>
- Torp, M., G. Holstad, and P. E. Granum. 2001. *Bacillus cereus*—Feeds and feces as major contamination sources in milk on a dairy farm. *Norsk Veterinærtidsskrift* 113:462–466. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75237-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75237-9)
- Vissers, M. M. M, F. Driehuis, M. C. te Giffel, P. De Jong, J. M. G. Lankveld. 2007. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *J. Dairy Sci.* 90:928–936. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71576-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71576-X)
- Yuan D.D., G. C. Liu, D. Y. Ren, D. Zhang, L. Zhao, C. P. Kan, Z. Y. Yang, W. Maa, Y. Li, L. B. Zhang. 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control* 25:752-757. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.020>

6 CONCLUSÃO

- 6.1. Baixas contagens tanto psicrotróficos quanto termodúricos foram observadas no leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica (baixa CBT);
- 6.2. Quase a metade dos isolados de psicrotróficos e termodúricos mésofilos apresentaram algum tipo de atividade deteriorante do leite, proteolítica e/ou lipolítica, o que implica na qualidade e vida útil do leite pasteurizado. Diretamente pela atividade deteriorante dos micro-organismos nas formas vegetativas ou indiretamente pela produção de exoproteases ou lipases termoestáveis no leite cru;
- 6.3. Entre os micro-organismos psicrotróficos que apresentaram potencial proteolítico no ensaio fenotípico, cepas de diversas espécies apresentaram o potencial de produção de metaloprotease alcalina: *Serratia ureilytica*, *Enterobacter kobei*, *Pseudomonas* spp., *Aerococcus urinaeequi*, *Yersinia enterocolitica* e *Stenotrophomonas rhizophila*;
- 6.4. A análise dos perfis genéticos hierárquicos revelou grande diversidade entre os psicrotróficos e termodúricos, mesmo em leite cru obtido com alta qualidade microbiológica;
- 6.5. Predominam entre os psicrotróficos deteriorantes do leite cru refrigerado de alta qualidade microbiológica: *Lactococcus lactis*, *Aerococcus urinaeequi*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Macroccoccus caseolyticus*, *Streptococcus parauberis* e *Enterococcus faecium*;
- 6.6. Entre os termodúricos, micro-organismos esporulados dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* predominam entre os deteriorantes, além de micro-organismos até não descritos como termodúricos ou deteriorantes do leite, bactérias ácido lácticas, agentes etiológicos de mastites e termofílicos; e,
- 6.7. Mesmo o leite cru refrigerado obtido de forma higiênica e com baixas contagens microbiológicas pode estar susceptível ao comprometimento da sua qualidade e vida útil após a pasteurização. Assim, deve-se estabelecer métodos que evitem e monitorem a contaminação do leite cru por micro-organismos produtores de proteases e lipases termoestáveis ou por aqueles que podem resistir à pasteurização e degradar os constituintes do leite.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Artigo submetido ao Journal of Dairy Science

ID: JDS-17-13086

Revisão do Inglês pelo *American Journal Experts*: 9D75-6ECD-44E5-1B20-010B**SPOILAGE POTENTIAL OF *Pseudomonas* FROM GOAT AND BOVINE RAW MILKS****Proteolytic and lipolytic potential of *Pseudomonas* species from goat and bovine raw milks**

J. C. Ribeiro Júnior¹, N. A. Augusto*, A. L. M. de Oliveira², E. A. Rios*, R. Tamanini*, V. Beloti*³

Proteolytic and lipolytic potential of *Pseudomonas* species from goat and bovine raw milks. Ribeiro Júnior. *Pseudomonas* is the main genus of milk psychrotrophics with spoilage potential. This work quantified *Pseudomonas* in goat and cow milk samples and evaluated the spoilage potential of the isolates under mesophilic and psychrotrophic conditions. It also identified the major species of these microorganisms that must be controlled to increase the technological milk potential after heat treatment in the dairy industries.

¹ Inspection of Animal Origin Products Laboratory, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

² Biochemistry and Biotechnology Department, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

³ Corresponding author: Vanerli Beloti, State University of Londrina, P. O. Box 10.011, Londrina, Paraná, Brazil, Zip Code 86.057-970, +55 43 3371 5617, Fax: +55 43 3371 4485, vbeloti@uel.br

ABSTRACT

Pseudomonas, the main genus of gram-negative microorganisms isolated from milk, are psychrotrophic, biofilm-forming, and thermotolerant enzyme producers. The aim of this study was to quantify *Pseudomonas spp.* in goat's and cow's milk produced in the Paraná state, Brazil, to evaluate the deteriorating activity of the isolates at mesophilic and psychrotrophic temperatures and to identify, at the species level, strains with alkaline metalloprotease (*aprX*) production potential. Microbiological, biochemical and molecular methods were used for isolating, confirming and identifying strains. The mean counts were 2.2 (\pm 1.55) and 0.75 (\pm 0.96) log CFU/mL for goat and bovine milk samples, respectively. Of the *Pseudomonas* strains isolated from goat milk (n = 60), 91.7% showed proteolytic potential when incubated at 35°C/48 h and 80% at 7°C/10 days, and lipolytic potential was observed in 95% of the isolates incubated in mesophilic and 78.3% at refrigeration temperatures. From the isolates of bovine milk (n = 20), 35% showed proteolytic activity only when incubated at 35°C/48 h, and lipolytic potential was observed in 25% of the isolates incubated at 7°C/10 d and 35°C/48 h. It was observed that 83.3% and 25% of the isolates genetically confirmed as *Pseudomonas spp.* of goat and bovine milk showed the potential for alkaline metalloprotease production, with the species *P. azotoformans*, *P. koreensis*, *P. gessardii*, *P. monteilii* and *P. lurida* being the most frequent in goat milk and *P. aeruginosa* the only specie identified in cow's milk.

Key words: metalloprotease, psychrotrophic, spoilage

INTRODUCTION

Microorganisms of the *Pseudomonas* genus are especially important for the quality of fluid milk and dairy products since they are considered dominant among the psychrotrophs (Dogan and Boor, 2003; Xin et al., 2017) and are important biofilm makers (Teh et al., 1994), which

is based on the production of proteolytic and lipolytic enzymes (Law, 1991; Sørhaug and Stepaniak, 1997; Baur et al., 2015). Among gram-negative bacteria isolated from milk, *Pseudomonas* is the genus with the highest potential for protease production (Sørhaug and Stepaniak, 1997; Baur et al., 2015). These enzymes can resist pasteurization and treatment by ultra-high temperature (UHT) processes (Alves et al., 2016), reducing the shelf-life of fluid milk and causing sensorial changes in dairy products (Law, 1991).

Pseudomonas can produce proteases at 20, 30, and 37°C (Teh et al., 2014) and multiply at temperatures up to 45°C (Caldera et al., 2016); 47% of the isolates in milk show proteolytic activity in quantitative assays (Caldera et al., 2016). These proteases can maintain 40% of their activity after treatment at 100°C for 5 minutes (Alves et al., 2016) and 50% when stored at 4°C for up to 12 days (Oh et al., 2000).

The metalloproteases are the main proteases produced by *Pseudomonas* (Ertan et al., 2015) and are important in the process of deterioration of food, especially in milk, because the availability of calcium makes it difficult to denature the proteases, conferring greater thermal resistance (Ertan et al. 2015; Stoeckel et al., 2016). In UHT milk, casein hydrolysis by metalloproteases causes gelling (Matéos et al., 2015; Stuknytė et al., 2016), and fermented or matured dairy products have a bitter taste (Fairbairn and Law, 1986) mainly because these enzymes maintain proteolytic activity at pH levels between 5 and 10 (Matéos et al., 2015). In addition, they account for 60% of the world trade of enzymes (Kuddus and Ramteke, 2012), emphasizing the importance of knowledge of the genera and species of microorganisms that produce these proteases due to their biotechnological potential.

The lipolytic activity of the microorganisms of the genus *Pseudomonas*, especially of the species *P. fluorescens*, is also important for industrial and chemical processes (Hakiminia et al., 2013). However, these lipases also act negatively on the quality of milk and derivatives, and little is known about the lipolytic activity of other *Pseudomonas* species.

Due to the absence of studies and the importance of the genus in goat and bovine milk produced in Brazil, the aim of this study was to quantify *Pseudomonas spp.* isolates from the milk of goats and cows by confirmation with genus-specific 16S rRNA PCR, to evaluate the proteolytic and lipolytic potential in mesophilic and psychrotrophic temperatures, and to identify, at the species level, the strains with the potential to produce alkaline metalloprotease (*aprX*).

MATERIAL AND METHODS

Milk Samples

Thirty-six samples of goat's milk and 20 samples of bovine milk from the state of Paraná, Brazil, were evaluated between November 2014 and May 2015. Samples were collected directly from bulk tanks in sterile flasks and sent under refrigeration to the Inspection of Animal Origin Products Laboratory of the State University of Londrina, Paraná, Brazil.

Pseudomonas count and biochemical tests

The counts of *Pseudomonas spp.* were carried out in accordance with ISO 11.059 (2009). After dilution of the milk in buffered peptone water, the samples were seeded in duplicate in pseudomonas agar base (Oxoid, Basingstoke, England), supplemented with potassium penicillin G (100,000 IU / L) (Sigma-Aldrich Biotechnology, St. Louis, USA) and Pimaricin (0.01 g/L) (Sigma), and incubated at 25°C for 48 hours.

For biochemical confirmation, the obtained colonies were subjected to glucose fermentation and oxidase production tests. Only the colonies that presented a negative result in the fermentation of the glucose and a positive result for the oxidase production were considered for counting.

DNA extraction

All isolates that showed biochemical results compatible with *Pseudomonas spp.* were cultured in tryptic soy broth (TSB) (Acumedia, Baltimore, USA) at 30°C for 48 hours to extract DNA by simple boiling as described by Ribeiro Júnior et al. (2016). The extracts were stored at -20°C for PCR assays.

Deteriorating potential

To verify the proteolytic capacity of the strains at mesophilic and refrigeration temperatures, after sowing in milk supplemented with 10% reconstituted skimmed milk powder (Acumedia, Baltimore, USA) (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007), plaques were incubated at 30°C for 48 hours and at 7°C for 10 days. The proteolytic activity of the isolates was verified by the formation of translucent halos around the colonies.

The alkaline metalloprotease production potential was confirmed using PCR of the *aprX* gene according to Bach et al. (2001). PCR primers and conditions are described in Table 1.

The PCR was performed with approximately 50 ng DNA template, 100 nM of each deoxynucleotide, 5 µl 10X buffer, 75 mmol L⁻¹ MgCl₂, 20 pmol L⁻¹ of each primer, and 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Amplification was performed in a thermocycler (Aeris™ Thermal Cycler, Esco Micro Pte. Ltd., Singapore) and the PCR amplified DNA samples were applied to a 1% agarose gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) and subjected to electrophoresis for 1 hour at a constant voltage of 90 V. The gels were stained with ethidium bromide solution at 0.2 mg.ml⁻¹ for 20 minutes and visualized in UV transilluminator

The lipolytic potential of the isolates was evaluated by plating the colonies on tributyrin agar (Himedia, Mumbai, India) supplemented with 1% tributyrin (Himedia) (Hantsis-Zacharov and

Halpern, 2007). The formation of translucent halos around the colonies after 48 hours of incubation at 30°C or 10 days at 7°C was considered positive for lipase production.

Confirmation and determination of species of Pseudomonas

For confirmation of the genus, all isolates characterized as *Pseudomonas spp.* by the biochemical method were submitted to PCR for amplification of a specific region of the 16S rRNA gene, with the primers and reaction conditions described in Table 1.

For the identification of the isolates that showed alkaline metalloprotease production potential (*aprX*), partial amplification of the 16S rRNA gene was performed using the primers and reaction conditions described in Table 1. The products of this PCR were purified (PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) and quantified (Qubit® dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) for DNA sequencing by the Sanger method (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA).

The quality of the sequences was evaluated by BioEdit v. 7.2.5, and the consensus sequences were generated by CAP 3 (Huang and Madan, 1999). Using Clustal W, these sequences were individually aligned with sequences representative of the 164 species of the genus *Pseudomonas* available from the Ribosomal Database Project (RDP). Phylogenetic analysis was performed using the Neighbor-joining method and the Tamura-Nei model using bootstrap support for 1000 replicates in MEGA v. 7.0 (Kumar et al., 2016).

RESULTS AND DISCUSSION

The plaque counts of *Pseudomonas spp.* ranged from 0.3 to 5.6 log CFU/mL for goat milk, with an average of 2.2 (\pm 1.55) log CFU / mL. For bovine milk, the counts were considerably lower, varying from 0.3 to 3.1 log CFU/mL, with a mean of 0.75 (\pm 0.96) log CFU/mL. These results can be attributed to technological differences and hygienic practices between

properties. The cattle-producing properties studied are highly technified, use treated water, have good environmental hygiene and rigorous milking hygiene practices, and 95.2% of samples had total bacterial counts lower than 10^5 CFU/mL (Ribeiro Júnior et al. 2015), which was not observed with goat milk properties.

Still, the counts observed in goat milk were lower than those found by other authors. In Minas Gerais state, Brazil, Scatamburlo et al. (2015) verified a mean of 3.9 log CFU/mL of *Pseudomonas spp.* in goat milk samples collected from refrigeration tanks. The lowest averages in the counts of *Pseudomonas spp.* in the milk samples of goats evaluated by the present study, in relation to the work of Scatamburlo et al. (2015), may be related to the fact that samples of this work were collected immediately after the milking of the animals. Thus, there was little time for microbial multiplication in the milk. The counts of *Pseudomonas spp.* can increase rapidly in bulk tanks, increasing from 2 to 4.5 log CFU/ml (De Jonghe et al., 2011) or 1.4×10^4 to 1.8×10^6 CFU/mL (Capodifoglio et al., 2016) during 96 hours of storage under refrigeration.

Considering only the isolation and biochemical tests of glucose and oxidase fermentation, 63 strains of *Pseudomonas* were obtained from goat milk and 36 from bovine milk. By PCRs specific for a region of the 16S rRNA gene, 60 (95.2%) of goat milk and 20 (55.5%) bovine milk isolates were confirmed as *Pseudomonas*, shown in Table 2. Thus, there were fewer *Pseudomonas* species genetically confirmed in bovine milk than those found in the initial plaque quantification.

Among the isolates from goat milk identified by the 16S rRNA PCR as belonging to the genus *Pseudomonas*, 91.7% demonstrated proteolytic potential when incubated at 35°C/48 h and 80% at 7°C/10 d; lipolysis was observed in 95% of the isolates incubated at mesophilic temperature and in 78.3% incubated at refrigeration temperature (Table 2). Thus, most of the isolates from goat milk presented proteolytic and lipolytic capacities simultaneously and

better expressed this capacity at a mesophilic temperature. The potential deterioration represented by *Pseudomonas* in the milk samples of goats evaluated by the present work will interfere with the shelf life of processed fluid milk and the sensorial quality of dairy products. For the isolates confirmed as *Pseudomonas* in bovine milk, 35% were proteolytic at 35°C/48 h. However, no proteolytic activity was observed when the isolates were incubated at 7°C/10 d. For lipolysis, 25% of bovine milk isolates demonstrated this capacity at 35°C/48 h and 7°C/10 d. Thus, in bovine milk, in addition to low counts, most of the isolates did not show potential for deterioration, especially at the refrigeration temperature, milk storage condition observed rigorously in all the properties studied. Baur et al. (2015) evaluated the deteriorating activity of *Pseudomonas* in bovine milk and verified that only 9.3% of the isolates of *Pseudomonas* had lipolytic activity.

As for the alkaline metalloprotease production potential (*aprX* gene) of the isolates confirmed as *Pseudomonas*, 49 strains in goats' milk (81.6%) and 5 (25%) from bovine milk presented the gene. For bovine milk, all isolates were obtained from the same milk sample. That is, 19 of the 20 bovine milk samples did not present any *Pseudomonas* strain potentially producing metalloprotease. In a similar study, Caldera et al. (2016) observed the presence of the *aprX* gene in 71.2% of the *Pseudomonas* isolates of bovine milk, indicating a higher quality and greater technological potential of bovine raw milk samples evaluated by the present study.

Additionally, five of the goats' milk isolates confirmed by PCR as *Pseudomonas spp.* that did not show the potential for alkaline metalloprotease production (*aprX* gene) phenotypically showed proteolytic activity in milk agar, which may be related to the production of other proteases.

The identification of the species of *Pseudomonas* with alkaline metalloprotease producing potential allowed us to verify the great diversity of the isolates of the goat's milk, from which 21 different species were identified (Table 3). The dominant species were *P. azotoformans*, *P.*

koreensis, *P. gessardii*, *P. monteilii* and *P. lurida*. On the other hand, *P. aeruginosa* was the only species identified in bovine milk.

The diversity of strains observed in goat milk is likely related to the lack of hygienic practices in milking, which allows a wide range of microorganisms to come into contact with milk. From the perspective of the microbial ecology of goats' milk, this diversity means low selective pressure in the environment, conferring a high diversity of *Pseudomonas* species. However, the samples of bovine milk, from better hygiene conditions, in addition to low counts, showed no variability. *P. aeruginosa* is an opportunistic microorganism in the environment, especially in water, that can cause mastitis and metritis and remain in the herd (Wright et al., 2015; Nan et al., 2016).

As for the proteolytic activity of *Pseudomonas species* positive for the *aprX* gene isolated from goat milk, some weights can be determined from Table 3. For example, from the 3 strains of *P. lurida*, 1 showed no proteolytic activity at 35°C/48 h, and another strain was not proteolytic at 7°C/10 d. The strain identified as *P. taetrolens* did not show proteolysis or lipolysis at 37°C/48 h but was proteolytic and lipolytic at 7°C/10 d. The strain of *P. fluorescens* was only proteolytic at 7°C/10 d and only lipolytic at 35°C/48 h. *P. simiae* presented only lipolytic activity at 35°C/48 h. *P. plecoglossicida* did not show lipolysis at 7°C/10 d. Finally, the isolate identified as *P. congelans* did not present deteriorating activity, although it was positive for the *aprX* gene. These observations, as reported in the study by Scatamburlo et al. (2015), indicate that variations in gene expression should be influenced by other genes or factors since the isolates of the same species with the *aprX* gene were observed either expressing the gene at different temperatures or not expressing it. Furthermore, there are proteolytic samples that do not carry the *aprX* gene, indicating that other proteases are being produced and that the proteolysis observed in the samples bearing the *aprX* gene may not be due to expression of this gene.

P. fluorescens represented only 1.8% of the *Pseudomonas* strains isolated from goat milk in this study and expressed proteolysis only at refrigeration temperature. However, their deteriorating milk activity should not be underestimated since recent studies point to the pronounced multiplication of this species in milk maintained at 4°C, increasing from 3 to 8.5 log CFU/mL in 170 hours (Lin et al., 2015). Scatamburlo et al. (2015) also verified the dominance of *P. fluorescens* in goat's milk (50% of the isolates), considering the identification through a species-specific PCR.

The 5 isolates of bovine milk bearing the *aprX* gene were identified as *P. aeruginosa*. Although these isolates originated from the same bovine milk sample, only 3 presented proteolytic activity at 35°C/48 h, and none presented proteolysis at 7°C/10 d, emphasizing the influence of other factors on gene expression and proteolysis as well as the low deteriorating activity of *Pseudomonas* in the bovine milk samples evaluated by the present study, especially when maintained under refrigeration.

During the manual milking of cows using the same process of obtaining goat milk samples as in the present study, Capodifoglio et al. (2016) found that the *Pseudomonas* counts on the surface of ceilings after pre-dipping reached 1.08×10^4 CFU/mL and on the cooling tank surfaces at 4.1×10^4 CFU/mL. This high contamination by *Pseudomonas* in the manual milking environment, often lacking hygienic measures, treated water, and the use of sanitizing substances, can influence the diversity of species of the genus in the milk of goats.

It is important to note that the gene encoding alkaline metalloprotease synthesis is extensively distributed among the *Pseudomonas* species, and almost all goat milk isolates showed a production capacity of proteases and lipases that can maintain activity even after thermal treatments of milk that eliminate the vegetative forms of *Pseudomonas*.

The concern with the deteriorating enzymes produced by *Pseudomonas* is so great that some alternatives have been proposed to reduce the technological problems caused by them in UHT

milk and derivatives, such as the use of purified *Pseudomonas* phages for the control of the microorganisms of the genus itself and other psychrotropic agents (Hu et al., 2016), using colorimetric methods applied to goat and sheep milk for the quantification of proteolytic activity for milk sorting of lots (Palomba et al., 2017), and other methods to deactivate these enzymes in milk destined for the production of long shelf life dairy products (Stoeckel et al., 2016).

However, avoiding the contamination of raw milk by *Pseudomonas* is shown as the best way to control the problems arising from the microbial enzymatic deterioration of milk and milk products. The correct treatment of water and the hygiene of systems for obtaining, storing and transporting milk are sufficient to control contamination of raw milk by *Pseudomonas* of any species, as well as other spoilage micro-organisms.

CONCLUSIONS

Considering that the milk samples were collected shortly after milking, high *Pseudomonas* spp. counts were observed, especially in goat's milk. This is due to the short generation time and high production capacity of deteriorating enzymes, including at refrigeration temperatures. Most of the isolates from goat milk were deteriorating, both lipolytically and proteolytically.

In the samples of bovine milk studied, the *Pseudomonas* counts were smaller, and some of the isolates showed potential deterioration, attributed mainly to the rigor of hygiene practices. In goat milk, we could observe a great variety of species carrying the gene *aprX*, mainly attributed to the absence of environmental selective pressure due to the lack of hygiene maintenance of goat milk production systems.

The *aprX* gene is dispersed among numerous species of *Pseudomonas* and, with it, the proteolytic potential. It is evident, however, that the gene expression depends on factors not

elucidated and not linked to the species, and it is clear that other proteases are produced by the genus *Pseudomonas*. The species bearing the *aprX* gene are *P. azotoformans*, *P. koreensis*, *P. gessardii*, *P. monteilii*, and *P. lurida*, which were dominant in the milk of goats. *P. aeruginosa* was the only one identified in bovine milk.

REFERENCES

- Alves, M. P., R. L. Salgado, M. R. Eller, P. M. P. Vidigal, A. F. de Carvalho. 2016. Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. *J. Dairy Sci.* 99:7842-7851. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11236>
- Bach, H. J., A. Hartmann, M. Schloter, J. C. Munch. 2001. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J. Microbiol. Methods* 44:173–182. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00239-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00239-6)
- Baur, C., M. Krewinkel, B. Kranz, M. Von Neubeck, M. Wenning, S. Scherer, M. Stoeckel, J. Hinrichs, T. Stressler, L. Fischer. 2015. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 49:23-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.005>
- Caldera, L., L. Franzetti, E. Van Coillie, P. de Vos, P. Stragier, J. de Block, M. Heyndrickx. 2016. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity

quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiol.* 54:142-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>

Capodifoglio, E., A. M. C. Vidal, J. A. S. Lima, F. Bortoletto, L. F. D'abreu, A. C. S. Gonçalves, A. C. N. Vaz, J. C. C. Balieiro, A. S. Netto. 2016. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *J. Dairy Sci.* 99:5214-5223. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10453>

De Jonghe, V., A. Coorevits, K. Van Hoorde, W. Messens, A. Van Landschoot, P. de Vos, M. Heyndrickx. 2011. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl. Envir. Microbiol.* 77:460-470. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00521-10>

Dogan, B. and K. J. Boor. 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:130–138. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.130-138.2003>

Ertan, H., C. Cassel, A. Verma, A. Poljak, T. Charlton, J. Aldrich-Wright, S. M. Omar, K. S. Siddiqui, R. Cavicchioli. 2015. A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. Isolated from refrigerated milk: role of calcium in improving enzyme productivity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 113:1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.010>

- Fairbairn, D. J. and B. A. Law. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53:139–177. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900024742>
- Hakiminia, F., B. Ranjbar, K. Khalifeh, K. Khajeh. 2013. Kinetic and thermodynamic properties of pseudomonas fluorescence lipase upon addition of proline. *Int. J. Biol. Macromol.* 55:123-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.046>
- Hantsis-Zacharov, E. and M. Halpern. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7162–7168. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00866-07>
- Hu, Z., X. C. Meng and F. Liu. 2016. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk. *Int. Dairy J.* 55:72-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.011>
- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868-877. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.9.9.868>
- ISO. 2009. ISO/TS 11059:2009 (IDF/RM 225: 2009)—Milk and milk products: Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.

- Kuddus, M. and P. W. Ramteke. 2012. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Crit. Rev. Microbiol.* 38:330-338. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2012.678477>
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. and Evol.* 33:1870-1874. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Law, B. A. 1991. Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Res.* 46:573–588. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900017611>
- Lin, H., M. Shavezipur, A. Yousef, F. Maleky. 2016. Prediction of growth of *Pseudomonas fluorescens* in milk during storage under fluctuating temperature. *J. Dairy Sci.* 99:1822-1830. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10179>
- Matéos, A., M. Guyard-Nicodème, F. Baglinière, J. Jardin, F. Gaucheron, A. Dary, G. Humbert, J. L. Gaillard. 2015. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *Int. Dairy J.* 49:78-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.008>
- Nan, L., G. Ren, D. Wang, K. Yang. 2016. Antibacterial performance of Cu-bearing stainless steel against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in whole milk. *J. Mater. Sci. Tech.* 32:445-451. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmst.2016.01.002>

- Oh, Y. S., L. Shih, Y. M. Tzeng, S. L. Wang. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 27:3-10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00172-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00172-6)
- Osborne, C. A., M. Galic, P. Sangwan, P. H. Janssen. 2005. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microb. Let.* 248:183-187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.043>
- Palomba, R., G. Formisano, A. Arrichiello, G. Auriemma, F. Sarubbi. 2017. Development of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. *Food Chem.* 221:1637-1641. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.125>
- Ribeiro Junior, J. C., R. Tamanini, L. C. C. da Silva, V. Beloti. 2015. Quality of milk produced by small and large dairy producers. *Semin-Cienc. Agrar.* 36:883-888. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n2p883>
- Ribeiro Junior, J. C., R. Tamanini, B. F. Soares, A. M. de Oliveira, F. G. Silva, F. F. da Silva, N. A. Augusto, V. Beloti. 2016. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semin-Cienc. Agrar.* 37:3069-3078. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>
- Scatamburlo, T. M., A. K. Yamazi, V. Q. Cavicchioli, F. A. Pieri, L. A. Nero. 2015. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *J. Dairy Sci.* 98:759-764. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8747>

- Sørhaug, T. and L. Stepaniak. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Tech.* 8:35-41.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01006-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01006-6)
- Stoeckel, M., M. Lidolt, T. Stressler, L. Fischer, M. Wenning, J. Hinrichs. 2016. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *Int. Dairy J.* 61:250-261.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.009>
- Stuknytė, M., M. Decimo, M. Colzani, T. Silvetti, M. Brasca, S. Cattaneo, G. Aldini, I. De Noni, I. 2016. Extracellular thermostable proteolytic activity of the milk spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens* PS19 on bovine caseins. *J. Dairy Sci.* 99:4188-4195. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-10894>
- Teh, K. H., D. Lindsay, J. Palmer, P. Andrewes, P. Bremer, S. Flint. 2014. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. *Int. J. Dairy Technol.* 67:176-181.
<http://dx.doi.org/10.1111/1471-0307.12114>
- Wright, E. A., V. Di Lorenzo, C. Trappetti, M. Liciardi, G. Orru, C. Vitie, C. Bronowska, A. J. Halla, A. C. Darbyf, M. R. Oggioni. 2015. Divergence of a strain of *Pseudomonas aeruginosa* during an outbreak of ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 175:105-113.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.011>

Xin, L., Z. Meng, L. Zhang, Y. Cui, X. Han, H. Yi. 2017. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. *Int. Dairy J.* 66:34-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.014>

Table 1. Primers and PCR cycling conditions.

Gene	Primers (5' – 3')	Size (pb)	PCR cycling conditions	Reference
<i>aprX</i>	TAYGGBTTC AAYTCCAAYAC	194	94°C-5m 30x (94°C-30s, 53°C-30s, 72°C-20s) 72°C-10m	Bach et al. (2001)
	VGCGATSGAMACRTTRCC			
<i>16S Pseudomonas</i> genus-specific	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	618	95°C-2m 25x (94°C-20s, 54°C-20s, 72°C-40s) 72°C-1m	Spilker et al. (2004)
	GGYTACCTTGTTACGACTT			
<i>16S rRNA</i>	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	94°C-5m 35x (94°C-1m, 58°C-1m, 72°C-1m) 72°C-10m	Osborne et al. (2005)
	GGYTACCTTGTTACGACTT			

Table 2. *Pseudomonas* strains isolated from goat and bovine milk, biochemical identification, molecular confirmation, alkaline metalloprotease production potential (*aprX*) and proteolytic and lipolytic activity in plaques.

Milk Origin	<i>Pseudomonas</i> spp. biochemical confirmation* (n)	Pseudomonas spp PCR confirmation approach		Proteolysis**				Lipolysis**				Presence of <i>aprX</i> gene**	
				35°C/48h		7°C/10d		35°C/48h		7°C/10d			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Goat	63	60	95,2	55	91,7	48	80	57	95	47	78,3	49	81,6
Cow	36	20	55,5	7	35	0		5	25	5	25	5	25

* Biochemical confirmation: negative glucose fermentation and positive oxidase

** Considering only the isolates confirmed in the genus-specific PCR.

Table 3. *Pseudomonas* species positive for the *aprX* gene isolated from Brazilian goat and bovine raw milk, and expression of proteolytic and lipolytic activity at mesophilic and psychrotropic temperatures.

<i>Pseudomonas</i> species	Total		Milk sample	Proteolytic		Lipolytic	
	n	%		35°C/48h	7°C/10d	35°C/48h	7°C/10d
<i>P. azotoformans</i>	8	14.8	Goat	8	8	8	8
<i>P. aeruginosa</i>	5	9.2	Cow	3	0	3	3
<i>P. koreensis</i>	4	7.4	Goat	4	4	4	4
<i>P. gessardii</i>	3	5.6	Goat	3	3	3	3
<i>P. lurida</i>	3	5.6	Goat	2	2	3	3
<i>P. monteilii</i>	3	5.6	Goat	3	3	3	3
<i>P. brenneri</i>	2	3.7	Goat	2	2	2	2
<i>P. lini</i>	2	3.7	Goat	2	2	2	2
<i>P. kilonensis</i>	2	3.7	Goat	2	2	2	2
<i>P. mucidolens</i>	2	3.7	Goat	2	2	2	2
<i>P. proteolytica</i>	2	3.7	Goat	2	2	2	2
<i>P. veronii</i>	2	3.7	Goat	2	2	2	2
<i>P. antarctica</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. chlororaphis</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. congelans</i>	1	1.6	Goat				
<i>P. ficuserectae</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i>	1	1.6	Goat		1	1	
<i>P. jessenii</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. lundensis</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	
<i>P. mediterranea</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. migulae</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. panacis</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. plecoglossicida</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	
<i>P. salomonii</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. simiae</i>	1	1.6	Goat			1	
<i>P. taetrolens</i>	1	1.6	Goat		1		1
<i>P. trivialis</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	1
<i>P. vancouverensis</i>	1	1.6	Goat	1	1	1	
Total	54	100		47	46	50	46