



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JOYCE BITENCOURT ATHAYDE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS
PROTEOLÍTICAS E LIPOLÍTICAS
AUTÓCTONES DO LEITE CRU NO MARANHÃO-BRASIL**

Londrina
2016

JOYCE BITENCOURT ATHAYDE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS
PROTEOLÍTICAS E LIPOLÍTICAS
AUTÓCTONES DO LEITE CRU NO MARANHÃO-BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Doutorado Interinstitucional em Ciência Animal entre a Universidade Estadual de Londrina e o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Profa. Dra. Vanerli Beloti.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lima, Joyce.

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS E LIPOLÍTICAS AUTÓCTONES DO LEITE CRU NO MARANHÃO-BRASIL / Joyce Lima. - Londrina, 2016.

100 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Coorientador: Ulisses Pereira.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Microbitoa deteriorante - Teses. 2. Qualidade - Teses. 3. Micro-organismos - Teses. 4. PCR - Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Pereira, Ulisses. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

JOYCE BITENCOURT ATHAYDE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS E
LIPOLÍTICAS AUTÓCTONES DO LEITE CRU NO MARANHÃO-
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Doutorado Interinstitucional em Ciência Animal entre a Universidade Estadual de Londrina e o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Elsa Helena Walter de Santana
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Profa. Dra. Lucienne Garcia Pretto-Giordano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ronaldo Tamanini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de março de 2016.

Dedico este trabalho aos Meus Pais
com amor.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo incansável incentivo aos meus estudos.

Ao meu esposo pelo companheirismo e dedicação a esta etapa da minha vida.

A minha orientadora, Prof. Dra. Vanerli Beloti, por sua gentileza em compartilhar seu conhecimento comigo.

Ao Prof. Dr. Ulisses Pereira co-orientador deste trabalho pela contribuição fundamental na etapa de biologia molecular e treinamentos ministrados.

Ao amigo José Ribeiro pela grande dedicação e humildade em contribuir com a realização desta pesquisa em todas suas etapas.

A toda equipe do LIPOA pela colaboração na realização deste trabalho e o carinho com o qual me recebeu.

Agradeço também ao Prof. Dr. André Luiz de Oliveira pela colaboração e a Médica Veterinária Dra. Brígida Alcântara pelos treinamentos sobre biologia molecular.

Além da Prof. Dra. Elis Lorenzetti que colaborou para as análises de sequenciamento no Laboratório de Virologia da UEL.

Aos amigos, companheiros de trabalho professores Aldivan Alves, Claucyane Vieira, Josilene Serra, Lidiane Soares e Rodrigo Calvet a quem em muitos momentos recorri e sempre estavam dispostos a ajudar.

A Prof. Dra. Roberta Freire pelo carinho e os cuidados em Londrina.

A turma do DINTER, em especial a colega e companheira de pesquisa Kleydejany Lemos.

A coordenação do DINTER IFMA-UEL.

Ao IFMA campus Caxias na pessoa do Prof. Dr. João da Paixão Soares pela compreensão da minha ausência.

Ao IFMA e a Capes pelos auxílios financeiros concedidos

Por fim agradeço a banca por gentilmente aceitar o convite para colaboração neste trabalho.

“A Vida é Combate”

(Gonçalves Dias)

LIMA, Joyce Bitencourt Athayde. **Caracterização genética de bactérias proteolíticas e lipolíticas autóctones do leite cru no Maranhão-Brasil.** 2016. 100f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O leite é um alimento completo e por ser um produto rico em nutrientes pode veicular vários agentes microbianos deteriorantes e/ou patogênicos. A microbiota deteriorante presente no leite diminui sua qualidade e conseqüentemente sua vida útil. No estado do Maranhão não existem informações quanto à microbiota deteriorante do leite. Dessa forma, o presente estudo objetivou caracterizar geneticamente bactérias proteolíticas e lipolíticas autóctones do leite cru no Maranhão-Brasil. Foram coletadas 10 amostras de leite cru em propriedades leiteiras, e bactérias mesófilas e psicrotróficas foram cultivadas em petrifilm ACTM e PCA por semeadura em superfície, incubadas a 7°C por 10 dias e 35°C/48h respectivamente. A avaliação das atividades proteolítica e lipolítica foi realizada utilizando-se semeadura em ágar leite e ágar tributirina, incubados à 32°C/48h, respectivamente, sendo as cepas deteriorantes agrupadas e identificadas geneticamente. Os resultados mostraram que duas amostras apresentaram contagens acima de 600 mil UFC/mL para contagem de bactérias mesófilas. Do total de 10 amostras de leite foram isoladas 1.102 cepas e foram identificadas geneticamente 166 (15,06%) cepas puras deteriorantes sendo 120 (72,28%) com atividade lipolítica, 27 (16,26%) proteolíticas; e 19 (11,44%) tanto proteolíticas como lipolíticas. A identificação genética das cepas mesófilas mostrou predominância de *Klebsiella* sp. com 95 (57,22%), seguida da bactéria *Acinetobacter* sp. com 19 (11,44%) cepas, *Pseudomonas aeruginosa* com 13 (7,83%), *Staphylococcus epidermidis* com 7 (4,21%), *Pseudomonas* sp. com 6 (3,61%), *Streptococcus dysgalactiae* com 5 (3,01%), *Bacillus* sp. com 4 (2,40%) *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis* com 3 (1,80%) cepas, *Acinetobacter baumannii*, *Empedobacter falsenii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp. e *Microbacterium* sp. com duas (1,20%) cepas cada e *Acinetobacter septicus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Brevibacillus* sp. e *Staphylococcus* sp. com uma (0,60%) cepa cada. Quanto às bactérias psicrotróficas os resultados mostraram baixas contagens e destas foi possível isolar 74 cepas, 27 (36,48%) com atividade deteriorante, sendo 17 (62,96%) com atividade lipolítica e 10 (37,03%) tanto atividade proteolítica como lipolítica. Quanto à identificação das cepas, 12 cepas (44,44%) foram identificadas como *Enterococcus* sp. gênero predominante; 7 (25,92%) como *Lactococcus garvieae*; 2 (7,40%) como *Bacillus* sp., *Hafnia alvei* e *Pantoea* sp. (cada uma) e uma (3,70%) como *Brevibacillus agri* e *Klebsiella* sp. (cada). A microbiota deteriorante presente foi em sua maioria lipolítica. A identificação genética mostrou variedade bacteriana mesófilas e psicrotrófica proteolíticas e/ou lipolíticas sendo parte desta patogênicas, presente no leite cru estudado inclusive espécies que ainda não haviam sido relatadas como microbiota deteriorante do leite no Brasil foram isoladas.

Palavras-chave: Microbitoa deteriorante. Qualidade. Micro-organismos. PCR.

LIMA, Joyce Bitencourt Athayde. **Genetic characterization of indigenous proteolytic and lipolytic bacteria from raw milk in Maranhão-Brazil.** 2016. 100p. Thesis (Doctoral in Animal Science)–Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Milk is a complete food and being a product rich in nutrients can serve various microbial spoilage agents and / or pathogens. The microbiota deteriorating in milk decreases its quality and therefore its life. In the state of Maranhão no information about the deteriorating microbiota of milk. Thus, this study aimed to characterize genetically indigenous proteolytic and lipolytic bacteria from raw milk in Maranhão, Brazil. Were collected 10 samples of raw milk in dairy farms, and mesophilic and psychrotrophic bacteria were grown in petrifilm ACTM and PCA by seeding surface, incubated at 7 ° C for 10 days and 35 ° C / 48h respectively. The evaluation of proteolytic and lipolytic activities was carried out using seeding on agar milk and tributyrin agar, incubated at 32 ° C / 48h, respectively, being grouped and identified genetically spoilage strains. The results showed that two samples had counts over 600 thousand CFU / mL for mesophilic bacteria counts. From a total of 10 milk samples were isolated and 1.102 strains were genetically you identify 166 (15,6%) pure strains of spoilage and 120 (72,28%) with lipolytic activity, 27 (16,26%) Proteolytic; and 19 (11,44%) both proteolytic and lipolytic. Genetic identification of mesophilic strains showed predominance of *Klebsiella* sp. 95 (57,22%), then the bacteria *Acinetobacter* sp. 19 (11,44%) of the strains, *Pseudomonas aeruginosa* with 13 (7,83%), *Staphylococcus epidermidis* with 7 (4,21%), *Pseudomonas* sp. 6 (3.61%), *Streptococcus dysgalactiae* with 5 (3.01%), *Bacillus* sp. 4 (2.40%) *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 3 (1,80%) strains, *Acinetobacter baumannii*, *Empedobacter falsenii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp. and *Microbacterium* sp. with two (1,20%) strains each and *Acinetobacter septicus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Brevibacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. with a (0,60%) strain each. As for psychotropic bacteria results showed low levels and these could be isolated 74 strains, 27 (36,48%) with deteriorating activity, 17 (62,96%) with lipolytic activity and 10 (37,03%) both proteolytic activity as lipolytic. The identification of strains, 12 strains (44,44%) were identified as *Enterococcus* sp. prevailing gender; 7 (25,92%) as *Lactococcus garvieae*; 2 (7,40%) as *Bacillus* sp., *Hafnia alvei* and *Pantoea* sp. (each) and one (3.70%) and *Brevibacillus agri* and *Klebsiella* sp. (each). The microbiota marring this was mostly lipolytic. Genetic fingerprinting showed mesophilic bacterial variety psychrotrophic and proteolytic and / or lipolytic being part of this pathogens present in raw milk even studied species had not been reported as deteriorating microbiota of milk in Brazil were isolated.

Keywords: Microbiota deteriorating. Quality. Microorganism. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Produção de leite no Brasil no período de 2009 a 2014 de acordo com os dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014)..... 17
- Figura 2** – Produção de leite na região nordeste do Brasil no ano de 2014 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014)..... 18
- Figura 3** – Produção de leite no nordeste do Brasil e no estado do Maranhão entre 2009 e 2014 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014) 18
- Figura 4** – Frequência n (%) de cepas proteolíticas e/ou lipolíticas de cada bactéria identificada, isoladas de leite cru de três regiões do estado do Maranhão entre setembro e outubro de 201447
- Figura 5** – Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 334pb do 16S rDNA de bactérias aeróbias mesófilas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,1% substituição de nucleotídeos48
- Figura 6** – Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 334pb do 16S rDNA de bactérias aeróbias mesófilas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,01% substituição de nucleotídeos49
- Figura 7** – Dendrograma construído por análise de similaridade e agrupamento usando o coeficiente de Dice e UPGMA dos padrões de Polymorphism in the Restriction Fragment Length (RFPL) com uso das enzimas Cfo1 (esquerda) e Taq1 (direita) para os perfís genéticos das cepas de bactérias psicotróficas deteriorantes isoladas de leite cru. Os códigos à direita das figuras representam a identificação das cepas estudadas. BioNumerics 7.570

- Figura 8 –** Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 292pb do 16S rDNA de bactérias psicrotróficas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,02% substituição de nucleotídeos.....72
- Figura 9 –** Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 390pb do 16S rDNA de bactérias psicrotróficas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,05% substituição de nucleotídeos.....72

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Bactérias proteolíticas e/ou lipolíticas isoladas de leite cru refrigerado da região sudeste do Brasil 26
- Quadro 2** – Bactérias proteolítica e/ou lipolíticas isoladas de leite cru refrigerado da região sul do Brasil 27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos de amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado coletados de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014..... 43
- Tabela 2** – Número e percentual de cepas deteriorantes isoladas de bactérias aeróbias mesófilas de amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado coletadas em propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014..... 45
- Tabela 3** – Cepas de bactérias aeróbias mesófilas proteolíticas e/ou lipolíticas identificadas por sequenciamento genético, e total de cepas análogas do grupo, isoladas do leite cru de três regiões do estado do Maranhão entre setembro e outubro de 2014 46
- Tabela 4** - Contagem de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado coletadas de três regiões do estado do Maranhão, nos meses de setembro e outubro de 2014 67
- Tabela 5** - Número e percentual de cepas psicotróficas deteriorantes em amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado, coletadas em propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014..... 69
- Tabela 6** – Identificação molecular e perfil de identidade das bactérias psicotróficas deteriorantes isoladas do leite cru coletado de propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014..... 71
- Tabela 7** – Bactérias mesófilas isoladas pela primeira vez como deteriorantes do leite cru no Brasil, adquirido de propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Hart Infusion</i>
DNA	Ácido desóxidorribonucléico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IFMA	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão
mm	Mili-mol
mL	Mililitro
mM	Mili-molar
MM	Mega-Molar
NaCl	Cloreto de Sódio
PCA	Plate Count Ágar
pmol	Pico-mol
TE	Solução Tris-EDTA Tris 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
µL	Microlitro
IN	Instrução Normativa
IFMA	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
AC	<i>Aerobic Count</i>
LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
UEL	Universidade Estadual de Londrina
RNA	Ácido Ribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
USA	<i>United Estates</i>
UV	Ultra-violeta
ng/mL	nanograma por mililitro
LOG	Logarítimo
pb	Pares de base
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
RFPL	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	ESTADO DA ARTE	16
2.1	PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL.....	16
2.2	PRODUÇÃO DE LEITE NO ESTADO DO MARANHÃO.....	17
2.3	QUALIDADE DO LEITE CRU NO BRASIL E ESTADO DO MARANHÃO.....	19
2.4	MICRO-ORGANISMOS AERÓBIOS E AERÓBIOS FACULTATIVOS MESÓFILOS.....	21
2.5	MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS.....	22
2.6	ATIVIDADE DETERIORANTE DE BACTÉRIAS NO LEITE.....	23
2.6.1	Sacrolíticos	23
2.6.2	Proteolíticos	24
2.6.3	Lipolíticos.....	25
	REFERÊNCIAS	28
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVOS GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	ARTIGO A - MICROBIOTA AERÓBIA MESÓFILA PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA ISOLADA DE LEITE CRU NO ESTADO DO MARANHÃO - BRASIL	35
5	ARTIGO B - BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS EM LEITE NO ESTADO MARANHÃO - BRASIL: CONTAGEM, ISOLAMENTO, E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DETERIORANTE	60
6	ARTIGO C - DESCRIÇÃO DE PATÓGENOS E OUTRAS BACTÉRIAS COMO DETERIORANTES DO LEITE CRU NO BRASIL	79
7	CONCLUSÃO	93

APÊNDICES	94
APÊNDICE A - Temperaturas ambiente nos dias de coleta das amostras de leite cru	95
APÊNDICE B - Temperaturas das amostras de leite cru refrigerado no momento da coleta.....	95
APÊNDICE C - Resultado do agrupamento de bactérias aeróbias mesófilas, cepa selecionada para sequenciamento, identificação genética e percentual de identidade	96
APÊNDICE D - Resultado do agrupamento de bactérias psicotróficas, cepa selecionada para sequenciamento, identificação genética e percentual de identidade.....	100

1 INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos de origem animal mais consumidos pelo homem, por ser nutricionalmente completo. Um copo de leite fornece diariamente a uma criança de 5 anos de idade 21% de suas necessidades de proteínas, 8% de calorias e os principais micronutrientes necessários. O consumo ao longo da vida fornece principalmente cálcio, magnésio, selênio, riboflavina, vitamina B12 e vitamina B5 (FAO, 2013). Por ser um produto de origem animal, pode veicular vários agentes potencialmente zoonóticos, e por ser um alimento muito rico em sua composição nutricional, favorece o crescimento microbiano (NERO et al., 2000).

Tipicamente o leite cru de vaca, contém uma população significativa de bactérias ácido lácticas que inclui os gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (QUIGLEY et al., 2013). Um número de outros micro-organismos pode estar presente em proporções significativas. Estes incluem psicrotóxicos, tais como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Aeromonas* spp., que crescem durante o armazenamento em refrigeração (RAATS et al., 2011).

Na Europa e Estados Unidos, a utilização de novos métodos para identificação da microbiota do leite cru de vaca, como o sequenciamento do DNA de bactérias, tem destacado que a diversidade desta microbiota é maior do que o originalmente relatado (QUIGLEY et al., 2013). No Brasil o estudo da microbiota deteriorante presente no leite tem revelado a bactéria *Pseudomonas* spp. com maior frequência e importância na sua deterioração, como nas pesquisas de Pinto et al. (2015) e Arcuri et al. (2008).

Para controlar a presença e multiplicação da microbiota do leite cru, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina através da Instrução Normativa nº 62 (IN 62) (Brasil, 2011) que o leite seja refrigerado na propriedade leiteira e ainda estabelece padrões físico-químicos e microbiológicos a serem cumpridos.

O leite produzido em várias regiões do país ainda não atende aos padrões determinados pela legislação. Entre as principais causas dessa situação estão as inadequadas condições de higiene de ordenha, procedimentos inadequados de limpeza de utensílios e equipamentos, e problemas ligados ao armazenamento do leite cru refrigerado e o seu transporte (NERO et al., 2008). Esta

situação pode ser decorrente do fato de que muitos produtores, geralmente, são desmotivados principalmente pela baixa lucratividade decorrente da falta de controle econômico e baixos índices zootécnicos (BELOTI et al., 2012). Desta forma, a qualidade é um dos maiores problemas da cadeia do leite no Brasil, interferindo negativamente na produção e rendimento dos derivados (SANTOS; FONSECA, 2007).

Após a determinação da refrigeração do leite foi observado em várias regiões do país que a microbiota mesófila se adapta à temperatura de refrigeração, manifestando sua capacidade psicrótrófica e promovendo a deterioração do leite (MARTINS et al., 2013; SANTOS et al., 2013). Enzimas termostáveis são as principais responsáveis pela deterioração do leite, como as proteases e lipases que provocam alterações no seu odor e sabor, e também de seus derivados (CHEN et al., 2003).

O leite pasteurizado tem a sua vida útil bastante curta, em torno de 4 dias no Brasil. Por esse motivo a produção e comercialização do leite *Ultra High Temperature* (UHT) supera a do leite pasteurizado, já que este produto apresenta maior vida útil (TRONCO, 2008).

No Brasil já foram realizadas pesquisas para identificação da microbiota deteriorante do leite cru, nos estados de Minas Gerais (Arcuri et al., 2008; Perin et al., 2012; Pinto et al., 2015), Rio de Janeiro (Arcuri et al., 2008), Paraná (Ribeiro Júnior, 2015) e Rio Grande do Sul (Nornberg et al., 2010), entretanto em grande parte do país ainda não existem dados quanto a esta microbiota. No estado do Maranhão, pesquisas relacionadas à qualidade do leite (Camargo, 2010; Lacerda et al., 2010) não apresentaram informações quanto a microbiota deteriorante presente.

Apesar da baixa produção no estado do Maranhão, 0,39 bilhão de litros em 2014 (IBGE, 2015), assim como, nos demais estados do Nordeste, essa produção tem sido crescente no decorrer dos anos seguindo o que acontece em todo o país (IBGE, 2015). Além disso, o Nordeste apresenta características próprias que oferecem potencialidades à produção de leite, como a intensa competição provocada por setores do turismo e lazer, setor imobiliário e pela produção de culturas agrícolas tecnificadas, além de preservação ambiental. Todos esses fatores favorecem o maior uso de tecnologias e utilização de menores áreas por parte do sistema de produção de leite (OLIVEIRA, 2015).

Desta forma, conhecer a microbiota deteriorante do leite cru produzido no estado do Maranhão irá contribuir para a melhoria da sua qualidade. Informações a respeito da microbiota deteriorante do leite proporcionarão identificar as possíveis fontes e causas da contaminação e, conseqüentemente eliminá-las. A vida útil e a qualidade do leite podem ser elevadas, agregando valor ao produto. Além disso, os índices de produção da região e o consumo de um leite de melhor qualidade serão incentivados. O ambiente favorável para esta produção será melhor aproveitado e contribuirá com a economia do estado e do país.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

O leite de vaca corresponde a 85% do consumo mundial de leite e o Brasil é o terceiro em produção empatando com a China e ficando atrás da Índia e EUA (FAO, 2013). O censo agropecuário realizado pelo IBGE, em 2006, mostrou que o Brasil possui 1,34 milhões de propriedades leiteiras, porém cerca de 940 mil comercializam seu produto. Do total de produtores inseridos na cadeia leiteira, 80% correspondem a pequenos produtores, sendo que 70% apresentam produção diária máxima de 50 litros/dia (RIBEIRO JÚNIOR, 2015). Em 2014 a produção de leite no Brasil chegou a 35,2 bilhões de litros e os laticínios no período de outubro de 2014 a setembro de 2015 processaram 24,3 bilhões de litros, gerando cerca de R\$ 123,50 bilhões (IBGE, 2015). Segundo os dados apresentados pelo IBGE, a produção leiteira tem sido crescente no Brasil, como mostra a figura 1.

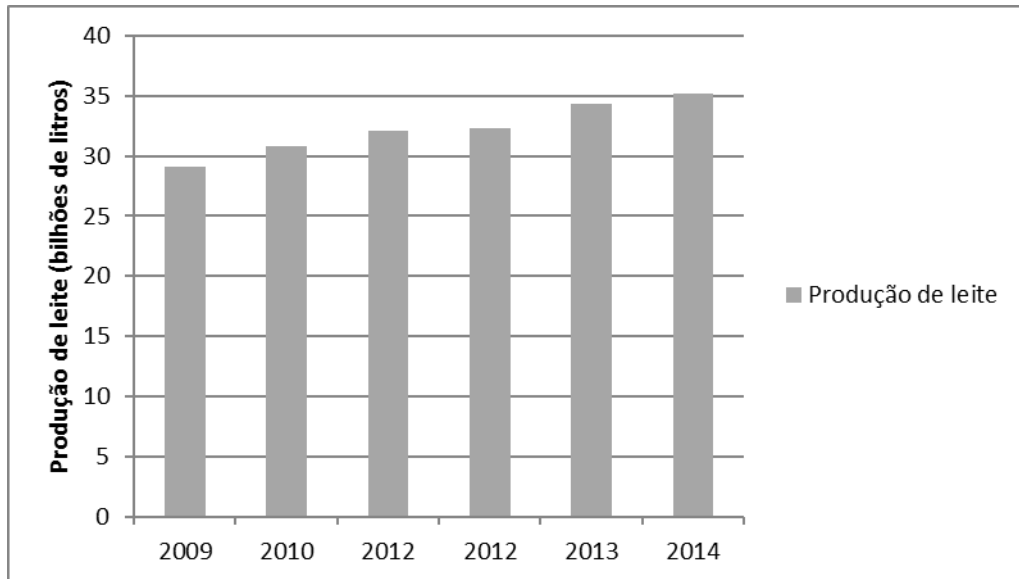


Figura 1-Produção de leite no Brasil no período de 2009 a 2014 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014). Fonte: Próprio autor.

2.2 PRODUÇÃO DE LEITE NO ESTADO DO MARANHÃO

Segundo dados do IBGE, o estado do Maranhão em 2014 ocupava a 16ª posição em produção de leite no Brasil com 0,39 bilhão de litros de leite produzidos. Na região nordeste era o 4º (figura 2). Entre outubro de 2014 e setembro de 2015 os laticínios adquiriram cerca de 77,16 milhões de litros de leite e processaram 76,98 milhões no estado (IBGE, 2015). Esta produção vem aumentando no decorrer dos anos, acompanhando o que acontece no país. Entretanto, observa-se que houve uma queda na produção de leite no Nordeste, inclusive no estado do Maranhão, no ano de 2012 (figura 3). Esta queda pode ser atribuída à seca que acometeu a região, reduzindo a produtividade e produção de leite. Houve uma perda de 4 milhões de animais em 2012, quando o semiárido viveu a mais intensa seca das últimas décadas. A seca resultou na redução de muitos plantéis, sobretudo o de bovinos, causando impactos sobre a produção e produtividade de leite IBGE (2013).

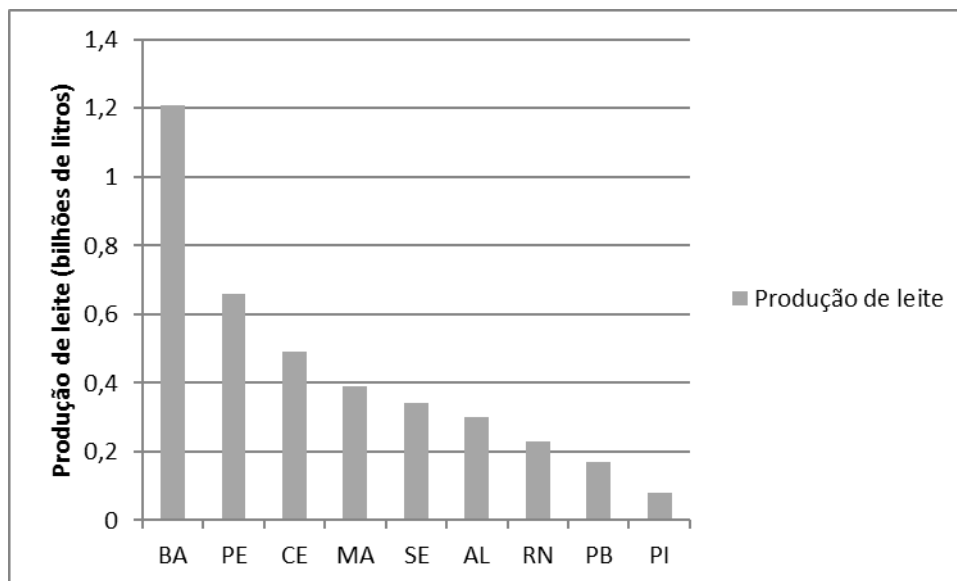


Figura 2-Produção de leite na região nordeste do Brasil no ano de 2014 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014). Fonte: Próprio autor.

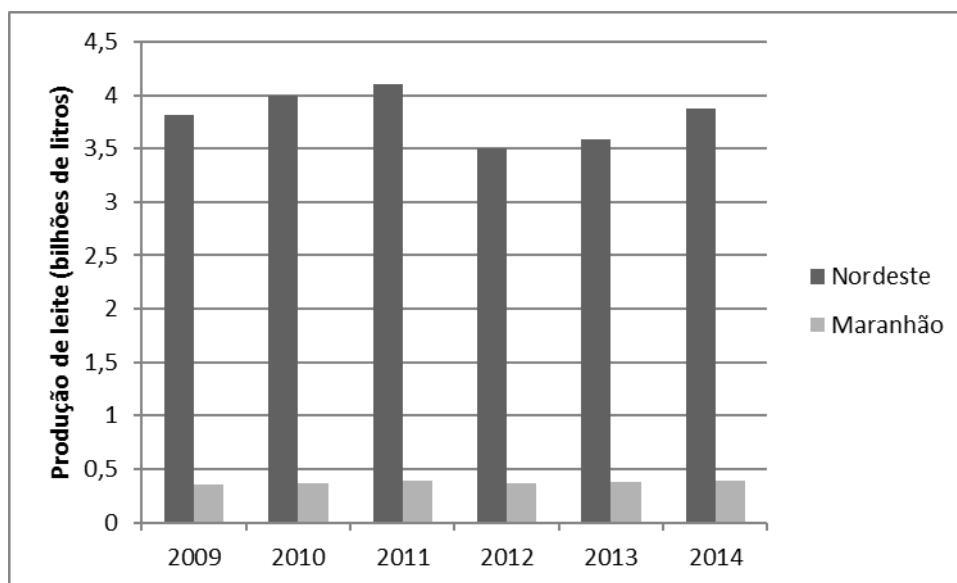


Figura 3-Produção de leite no nordeste do Brasil e no estado do Maranhão entre 2009 e 2014 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014). Fonte: Próprio autor.

Apesar dos dados do IBGE demonstrarem que o aumento da produção no Nordeste tem sido crescente, acompanhando o que acontece no Brasil, pode-se dizer que a produção de leite nesta região ainda apresenta níveis de produtividade do rebanho muito aquém do seu potencial de produção. Provavelmente devido ao baixo nível tecnológico e zootécnico predominante nas propriedades e à prevalência de sistemas de produção ineficientes (SEBRAE, 2013).

O estado do Maranhão não foge à regra da região, apesar de investimentos e incentivos à produção e industrialização do leite desde o ano de 1995 com a implantação do programa Leite é Vida pelo governo do estado. Este programa foi intensificado em 2004, quando também foi adotado para o restante do Nordeste pelo Governo Federal como “Programa Leite Fome Zero” (Programa de Aquisição e Distribuição de Leite – PAA).

Dentre os objetivos do programa destacam-se: aumento no volume de leite captado pelas indústrias, inserção de produtores de base familiar no mercado formal e o aumento do consumo de leite processado de melhor qualidade. Apesar dos investimentos do governo federal e governos estaduais alguns problemas surgiram: poucos produtores se interessaram em fornecer leite ao programa, o limite de compra reduzido por produtor, falta de organização dos produtores e estrutura de captação de leite precária. A solução envolve maior atuação dos governos e dos laticínios participantes além de atitudes dos próprios produtores de leite (SEBRAE, 2013).

2.3 QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO NO BRASIL E NO ESTADO DO MARANHÃO

A qualidade do leite cru refrigerado no Brasil é regulamentada, atualmente, pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011), que determina padrões de qualidade por região do país, mais exigentes com o decorrer dos anos. Desde a implantação da legislação anterior, Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002), a qualidade do leite brasileiro tornou-se uma preocupação entre os pesquisadores do país. Uma vez que boa parte dos produtores do Brasil tem um rebanho de pequeno porte, com baixo potencial tecnológico e deficiência de acompanhamento profissional. Logo, se adequar aos padrões de exigências, nestas condições, seria um desafio.

Diversos pesquisadores constataram que muitas propriedades, em diversas regiões do país, não estão conseguindo adequar a qualidade do leite aos padrões exigidos (ANDRADE et al., 2014; BELOTI et al., 2012; MATTOS et al., 2010; MARTINS; REIS, 2014; PERIN et al., 2012; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2011).

Na região nordeste Andrade et al. (2014) analisando amostras de leite cru refrigerado no Rio Grande do Norte verificaram que a média da contagem bacteriana foi de 7×10^5 UFC/mL, sendo o padrão determinado pela legislação para a região nordeste no período da pesquisa 6×10^5 UFC/mL. Também na mesma região do Brasil, Mattos et al. (2010) estudando a microbiota do leite cru refrigerado em Pernambuco, verificaram que 83% das propriedades leiteiras produziam leite com contagens microbianas superiores a 10^6 UFC/mL.

No estado do Maranhão Lacerda et al. (2010) avaliando a qualidade do leite de três municípios do estado verificaram contagens bacterianas totais de 677,90 UFC/mL e 8421,35 UFC/mL de acordo com o período do ano, atribuindo as elevadas contagens às falhas no manejo, principalmente em relação aos cuidados higiênicos e sanitários na ordenha.

Camargo (2010) avaliando a presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite cru de propriedades de quatro bacias leiteiras do estado do Maranhão observou que as amostras apresentavam resíduos de antimicrobianos e desrespeitavam a IN 51 quanto à refrigeração do leite. Lacerda et al. (2009), avaliando a qualidade da água utilizada para higienização do úbere dos animais, equipamentos e utensílios de ordenha, em propriedades leiteiras de três municípios do estado do Maranhão, observaram que a maioria das propriedades apresentava qualidade da água insatisfatória, com 90% das amostras apresentando contagens de coliformes totais variando de ausência à contaminação máxima tabelada ($> 2419,6$ NMP) e 75% das amostras com contagens de *Escherichia coli* variando de ausência a 344,1 NMP. A água contaminada utilizada no ambiente de ordenha, pode atuar como via de transmissão de micro-organismos para a glândula mamária e comprometer a qualidade do leite.

O conhecimento e o monitoramento da qualidade do leite como forma de cumprir as Instruções Normativas 51 e 62, adequando a qualidade do produto a partir da sua origem às exigências do mercado interno e externo, são fundamentais para a Região Nordeste. Tal situação permitiria a melhoria da

qualidade do leite produzido com reflexos sobre a renda dos produtores, bem como o fortalecimento das indústrias na economia regional, garantindo a sustentabilidade do agronegócio do “leite” (SEBRAE, 2013).

Segundo Beloti et al. (2012) uma alternativa para incentivar a produção de leite com melhor qualidade é o pagamento por qualidade do leite aos produtores. Como acontece na região do sul do Brasil na bacia leiteira de Castro-PR, onde os produtores produzem leite com menos de 10^4 UFC de aeróbios mesófilos por mL. Eles fazem parte de programas de pagamento por qualidade do leite, sendo estimulados a trabalhar continuamente na melhoria da qualidade do seu produto (RIBEIRO JÚNIOR, 2015).

A importância de melhorar a qualidade do leite cru refrigerado é, principalmente, para elevar a vida útil do leite pasteurizado com reflexo positivo em todos os derivados. No Brasil, o prazo de validade do leite pasteurizado é apenas de 4 dias o que desestimula o seu consumo, fazendo com que os brasileiros deixem de usufruir com maior frequência de uma fonte de nutrientes rica como o leite.

2.4 MICRO-ORGANISMOS AERÓBIOS E ANAÉROBIOS FACULTATIVOS MESÓFILOS

Quando os micro-organismos utilizam o oxigênio atmosférico como aceptor, ou receptor final de elétrons, são considerados aeróbios, e quando utilizam outros compostos, são anaeróbios. Os anaeróbios facultativos são aqueles que podem crescer em meio anaeróbio, mas crescem melhor na presença de oxigênio. Os micro-organismos mesófilos são todos aqueles capazes de se multiplicar em temperaturas de 35° - 37° C sejam eles aeróbios ou anaeróbios estritos ou não. Indicam a qualidade sanitária com a qual o alimento foi obtido ou processado. Um número elevado desses micro-organismos indica que o alimento é insalubre, mesmo que, micro-organismos patogênicos não estejam presentes. No entanto, deve-se considerar que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas e, portanto, uma alta contagem de mesófilos pode significar que houve condições para o crescimento de patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Devido às temperaturas médias elevadas no Brasil, pode-se considerar que mesófilos são os micro-organismos que se multiplicam no leite quando este está em temperatura ambiente. Boa parte dos micro-organismos mesófilos tem metabolismo sacarolítico, por que os carboidratos abundam na

natureza e seu metabolismo gera maiores quantidades de energia. Como o leite é rico em carboidratos, quando em temperatura ambiente, oferece condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos sacarolíticos, gerando elevada acidez no leite quando a contaminação por estes micro-organismos é alta (BELOTI, 2015).

O controle da microbiota mesófila no leite é de grande importância para assegurar a qualidade do alimento, para que este não ofereça riscos à saúde do consumidor, e tenha suas características físico-químicas e organolépticas garantidas no consumo (NERO et al., 2009). Para controlar a microbiota mesófila e o processo de acidificação decorrente da degradação da lactose, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA determina padrões aceitáveis para contagem bacteriana total no leite, que varia de acordo com a evolução cronológica e a região do país, através das legislações IN 51 (BRASIL, 2002) e IN 62 (BRASIL, 2011).

2.5 MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS

Micro-organismos psicotróficos são aqueles que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 40°C, mas que podem crescer em temperaturas abaixo de 7°C. Os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Listeria*, *Yersinia*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Clostridium* são os principais micro-organismos psicotróficos (SANTOS; FONSECA, 2007).

Desde a exigência da refrigeração do leite cru na propriedade leiteira, em 2002 com a IN 51, benefícios em relação à qualidade do leite foram observados, uma vez que, a refrigeração reduz a multiplicação da microbiota mesófila e, conseqüentemente, a acidificação do leite. Porém, esse procedimento, quando o binômio tempo x temperatura não ocorre de forma adequada, proporciona a seleção de micro-organismos psicotróficos (PINTO et al., 2015). Alguns destes micro-organismos são capazes de provocar doenças aos seres humanos pela ingestão de leite cru. No entanto, o maior problema relacionado às bactérias psicotróficas é o fato de elas serem capazes de produzir enzimas que resistem ao tratamento térmico (SANTOS; FONSECA, 2007).

A ação de enzimas termoresistentes que degradam proteínas e gordura do leite pode provocar alterações interferindo na sua durabilidade e

causando perdas nos seus derivados e conseqüentemente, problemas econômicos significativos para a indústria de laticínios (BARBOSA et al., 2009).

A legislação pertinente não estabelece padrão para contagem de micro-organismos psicotróficos em leite cru refrigerado. Entretanto, Beloti (2015) relata que no primeiro Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), há um balizamento sobre a quantidade tolerável de psicotróficos, recomendando que a população não ultrapasse 10% da população de aeróbios mesófilos.

2.6 ATIVIDADE DETERIORANTE DE BACTÉRIAS NO LEITE

As enzimas utilizadas pelos micro-organismos que promovem degradação de nutrientes do leite estão relacionadas com suas preferências nutricionais. Quanto a estas preferências os micro-organismos são classificados em sacarolíticos, proteolíticos e lipolíticos, conforme tenham maior facilidade em degradar açúcares, proteína ou gordura (BELOTI, 2015).

2.6.1 Sacarolíticos

Os micro-organismos sacarolíticos são aqueles que possuem predominantemente vias metabólicas para a degradação de carboidratos que são os nutrientes preferidos pelos micro-organismos, pois sua degradação é mais rápida e fácil e gera grande quantidade de energia. O metabolismo de qualquer carboidrato envolve sua degradação até a glicose. No caso do leite de vaca, o único açúcar é a lactose. Então, sobrevivem melhor no leite os micro-organismos sacarolíticos que apresentam a enzima galactosidase, que cliva a lactose em glicose e galactose. O principal metabólito produzido pelas bactérias sacarolíticas é o ácido láctico, principal causa de acidificação do leite (BELOTI, 2015).

A enzima β -D-galactosidase (lactase) é a responsável pela degradação da lactose pelos micro-organismos no leite, catalisando a reação de hidrólise da lactose em β -D-galactose e α -D-glicose. Além disso, o metabolismo sacarolítico é favorecido quando o leite não é refrigerado, mantido em temperatura ambiente após a ordenha, pois, a temperatura ótima dessa enzima é de 35°C (ANDRADE, 2005).

Segundo Beloti (2015) no grupo dos coliformes todos os gêneros conseguem degradar a lactose, devido ao fato de possuírem uma sequência de genes, chamada *operon lac*, que determina a produção de várias enzimas necessária à degradação da lactose. Franco; Landgraf (2008) afirmam que os principais grupos de micro-organismos sacarolíticos são os coliformes e bactérias ácido lácticas.

2.6.2 Proteolíticos

A atividade proteolítica das bactérias no leite expressa-se, mais especificamente, sobre as porções glicosiladas e hidrofílicas da k-caseína resultando na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite. Atividade similar à ação da quimosina (coalho) sobre as frações proteicas do leite no processo de fabricação dos queijos (RECIO et al., 2000).

A clivagem e consequente floculação das micelas de caseína geram geleificação do leite UHT (Datta; Deeth, 2001) e dificuldades para obtenção dos parâmetros físico-químicos necessários na fabricação de queijos (RAYNAL, REMEUF, 1998). Outra consequência da proteólise no leite é o sabor amargo causado pelo acúmulo de dipeptídeos e de aminoácidos, principalmente tirosina (CHEN et al., 2003).

Uma vez que a refrigeração do leite reduz a atividade enzimática da microbiota sacarolítica, conseguem sobreviver à temperatura de refrigeração bactérias que possuem outras vias metabólicas como é o caso de bactérias psicotróficas que metabolizam proteínas (BELOTI, 2015). Desta forma, as bactérias psicotróficas são as principais responsáveis pela proteólise no leite. São conhecidos proteolíticos as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Serratia* e *Bacillus* spp. (FORSYTHE, 2013).

A fração proteica representada pela caseína é facilmente degradada pelas proteases dos psicotróficos por causa de sua estrutura não helicoidal. Adicionalmente, quando o leite é refrigerado, ocorre maior dissociação das micelas de caseína, quando comparado com o leite mantido a 35°C e aumenta a fração de caseína solúvel, o que a torna mais sensível à proteólise pelas enzimas de origem bacteriana (SANTOS; FONSECA, 2007).

Entretanto, a microbiota mesófila também pode apresentar significativo grau de proteólise dependendo da quantidade de células bacterianas presentes. Em amostras de leite cru com contagens inferiores a 10^4 UFC/mL o grau de proteólise é significativamente menor do que em amostras com contagens entre 10^5 UFC/mL e 10^6 UFC/mL (GILLIS et al., 1985).

2.6.3 Lipolíticos

Micro-organismos lipolíticos são aqueles que conseguem sintetizar todos os nutrientes que precisam, tendo como principal fonte de carbono e energia os lipídios. Portanto, as vias metabólicas predominantes ou ativas no micro-organismo destinam-se à degradação de gorduras (BELOTI, 2015).

Para que as enzimas lipolíticas tenham acesso aos lipídios no interior do glóbulo de gordura, é necessário que haja o rompimento da membrana fosfolipídica, o que envolve ação mecânica ou enzimática de fosfolipases e glicosidases. As fosfolipases de origem microbiana podem, assim, hidrolisar os fosfolipídios da membrana do glóbulo de gordura e, conseqüentemente, aumentar a capacidade lipolítica das lipases sobre os triglicerídios. Como resultado ocorre a formação de ácidos graxos livres, mono e diglicerídios, resultando em altos níveis de ácido butírico e caproíco (SANTOS; FONSECA, 2007).

Outra enzima lipolítica é a carboxilesterase que hidrolisa apenas pequenas moléculas de ésteres, praticamente hidrossolúveis, enquanto que, as fosfolipases exibem atividade máxima na degradação de ácidos graxos de cadeia longa insolúveis em água (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Como resultado da ação das enzimas lipolíticas no leite, ocorrem alterações de características sensoriais no leite fluido e rancificação em queijos (CHEN et al., 2003).

Entre os principais gêneros produtores de lipases estão *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp. e *Alcaligenes* spp. (FORSYTHE, 2013). Bactérias do gênero *Bacillus* spp. também são lipolíticas e têm sido utilizada para a produção de lipases com potencial biotecnológico, assim como, *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp. (ARPIGNY; JAEGER, 1999).

No Brasil algumas bactérias apresentando atividade proteolítica e/ou lipolítica em leite cru refrigerado já foram identificadas nas regiões sul e sudeste do Brasil, conforme os quadros 1 e 2.

Quadro 1- Bactérias proteolíticas e/ou lipolíticas isoladas de leite cru refrigerado da região sudeste do Brasil.

Autor	Região	Bactéria	Método para identificação
Arcuri et al. (2008)	Minas Gerais e Rio de Janeiro	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sistema API (BioMérieux, Marcy l'Etoile França)
		<i>Pseudomonas putida</i>	
		<i>Pseudomonas</i> spp.	
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	
		<i>Aeromonas caviae</i>	
		<i>Aeromonas sobria</i>	
		<i>Aeromonas</i> spp.	
		<i>Pantoea</i> spp.	
		<i>Burkholderia cepacea</i>	
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	
		<i>Klebsiella</i> sp.	
		<i>Hafnia alvei</i>	
		<i>Erwingella americana</i>	
		<i>Moraxella</i> spp.	
		<i>Chryseomonas luteola</i>	
		<i>Serratia</i> spp.	
		<i>Yersinia</i> spp.	
		<i>Enterobacter</i> sp.	
		<i>Alcaligenes faecalis</i>	
		<i>Pasteurella</i> sp.	
		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
		<i>Methylobacterium</i> sp.	
		<i>Kurtia</i> spp.	
<i>Bacillus</i> sp.			
<i>Bacillus coagulans</i>			
<i>Bacillus lentus</i>			
<i>Brevibacterium</i> sp.			
<i>Cellum/Microbacterium</i>			
<i>Staphylococcus</i> spp.			
Perin et al. (2012)	Minas Gerais	<i>Enterobacter</i> spp.	Bactray Kits (Laboclin Ltda, Curitiba, PR, Brazil) API (BioMérieux, sigma, France)
		<i>Acinetobacter</i> spp.	
		<i>Hafnia</i> spp.	
		<i>Pseudomonas</i> spp.	
		<i>Serratia</i> spp.	
		<i>Tatumella</i> spp.	
		<i>Aeromonas</i> spp.	
		<i>Citrobacter</i> spp.	
		<i>Ochrobactrum</i> spp.	
		<i>Stenotrophomonas</i> spp.	
		<i>Escherichia</i> spp.	
<i>Klebsiella</i> spp.			
Pinto et al. (2015)	Minas Gerais	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	API (BioMérieux, La Balme les Grottes, France) Bac Tray (Difco, Lawrence, EUA) Microbiol Identification System – MIS, versão 4.0
		<i>Acinetobacter lowfii</i>	
		<i>Serratia liquefaciens</i>	
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	
		<i>Lactococcus</i> sp.	
		<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	
		<i>Staphylococcus sciuri</i>	
		<i>Paenibacillus macerans</i>	
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	
		<i>Burkholderia cepacia</i>	
		<i>Chryseomonas luteola</i>	
<i>Bacillus alvei</i>			

Fonte: próprio autor.

Quadro 2- Bactérias proteolíticas e/ou lipolíticas isoladas de leite cru refrigerado da região sul do Brasil.

Nornberg et al. (2010)	Rio Grande do Sul	<i>Burkholderia cepacia</i>	Sistema API (BioMérieux, Marcy l'Etoile França)
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	
		<i>Aeromonas sp.</i>	
*Ribeiro Júnior. (2015)	Paraná	<i>Bacillus Licheniformis</i>	Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA
		<i>Bacillus sp.</i>	
		<i>Paenibacillus sp.</i>	
		<i>Bacillus pumilus</i>	
		<i>Bacillus circulans</i>	
		<i>Brevibacillus sp.</i>	

*Neste estudo foram identificadas somente as bactérias esporuladas deteriorantes do leite.

Fonte: próprio autor.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, UFU, Uberlândia-MG, 97f., 2005.

ANDRADE, K. D.; RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; MEDEIROS, H. R.; BEZERRA, K. C.; BEZERRIL, R. F.; LIMA JÚNIOR, D. M. Qualidade do leite bovino nas diferentes estações do ano no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias** 21, 213-216, 2014.

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 psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural** 38, 2250-2255, 2008.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal** 343, 177-183, 1999.

BARBOSA, J. B.; TALMA, S. V.; BATISTA, C. S.; MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O. Avaliação de rendimento da produção dos queijos minas frescal, minas padrão e mussarela fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 371, p. 26-33, 2009.

BELOTI, V. Microrganismos de Importância no Leite. In:_____. (Org). **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015. p. 109-221.

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** 388, 05-10, 2012.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62: Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo A, tipo B, tipo C e cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 set. 2002, p. 13, Seção 1.

CAMARGO, S. C. A. **Utilização do DELVOTEST® SP – NT, eclipse 50 e twinsensor – BT 20 na detecção de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite “in natura” provenientes de quatro bacias leiteiras do estado do Maranhão**. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, UEMA, São Luís-MA, 116f., 2010.

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

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk - a review. **Food and Bioproducts Processing** 79, 4,197-210, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). Faostat. **Countries by commodity**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 03/02/2016

FORSYTHE, S. J. Flora microbiana e conservação de alimentos. In: _____. (Org). **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013. p. 143-148.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GILLIS, W. T.; CARTLEDGE, M. F.; RODRIGUES, I. R.; SUAREZ, E. J. Effect of raw milk quality on ultra-high temperature processes milk. **Journal of Dairy Science** 68, 2875-2879, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo agropecuário de 2006**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br> >. Acesso em: 27 de janeiro de 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estatística da produção pecuária em 2014**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1086&z=t&o=24>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores IBGE: **Estatística da produção pecuária**. 2013, p. 5-41.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Pecuária Municipal de 2014**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ppm/default.asp>>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa trimestral do Leite julho-setembro de 2015**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/default.asp?t=2&z=t&o>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2016.

LACERDA, L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três Municípios do estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico** 76, 569-575, 2009.

LACERDA, L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite de propriedades leiteiras nos municípios de

Miranda do Norte, Itapecuru-Mirim e Santa Rita, Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico** 77, 209-2015, 2010.

MARTINS, E. S.; REIS, N. E. V. Qualidade microbiológica do leite cru em função de medidas profiláticas no manejo de produção. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** 08, 1348-1359, 2014.

MARTINS, M. L.; CARVALHAES, J. F.; SANTOS, L. J.; MENDES, N. S.; MARTINS, E. M. F.; MOREIRA, G. I. P. Qualidade do leite cru dos tanques de expansão individuais e coletivos de um laticínio do município de Rio Pomba, MG – Um estudo de caso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 68, 24-32, 2013.

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** 31, 173-182, 2010.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de micro-organismos indicadores em leite – Utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias** 21, 115-126, 2000.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BARROS, M. A. F.; ORTOLONI, M. B. T.; BELOTI, V. FRANCO, B. D. G. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health** 55, 299-305, 2008.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 29, 386-390, 2009.

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

OLIVEIRA, A. A. Desafios para a produção de leite no Nordeste. **Portal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2697798/artigo-desafios-para-a-producao-de-leite-no-nordeste#>> Acesso em: 03/02/2016

PERIN, L.M.; MORAES, P. M.; ALMEIDA, M. V.; NERO, L. A. Interferência de Temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicrófilas, lipolítica e proteolítica de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias** 33, 333-342, 2012.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S. G.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrófilas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 70, 105-116, 2015.

QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology** 37, 664-698, 2013.

RAATS, D.; OFFEK, M.; MINIZ, D.; HALPEN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology** 28, 465-471, 2011.

RAYNAL, K.; REMEUF, F. The effect of heating on physicochemical and renneting properties of milk: A comparison between caprine, ovine and bovine milk. **International Dairy Journal** 8, 695-706, 1998.

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

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. **Microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, UEL, Londrina-PR, 71f., 2015.

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 Candido Tostes** 68, 5-11, 2013.

SANTOS, A. S.; PIRES, C. V.; SANTOS, J. M.; COSTA SOBRINHO, P.S. Crescimento de micro-organismos psicotróficos em leite cru refrigerado. **Brazilian Journal of Food and Nutrition** 24, 297-300, 2013.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicotróficas e qualidade do Leite. In: _____. (Org). **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. São Paulo: Editora Manole, 2007. p. 245-252.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. **Cenário para o leite e derivados na região nordeste em 2020**. Recife: SEBRAE, 2013. p. 13-154.

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** 32, 267-276, 2011.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite** (3ª ed.) Santa Maria: UFSM, 206 pp., 2008.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente bactérias proteolíticas e/ou lipolíticas autóctones do leite cru do Estado do Maranhão-Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Quantificar micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos em leite cru refrigerado e não refrigerado adquirido em propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão.
- 3.2.2 Verificar atividade proteolítica e lipolítica das cepas bacterianas isoladas de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos em leite cru refrigerado e não refrigerado adquirido em propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão.
- 3.3.3 Identificar geneticamente as cepas bacterianas com atividades proteolítica e/ou lipolítica, isoladas de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos em leite cru refrigerado e não refrigerado adquirido em propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão.
- 3.3.4 Analisar e agrupar as cepas bacterianas aeróbias mesófilas e psicrotróficas proteolíticas e/ou lipolíticas, identificadas geneticamente, em árvore filogenética.

4 ARTIGO A

MICROBIOTA MESÓFILA PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA ISOLADA DE LEITE CRU NO ESTADO DO MARANHÃO - BRASIL

RESUMO

Os micro-organismos mesófilos são de grande importância para a avaliação da qualidade microbiológica do leite cru por indicarem falhas de higiene no processo de produção. A quantidade de micro-organismos mesófilos no leite está relacionada à vida útil do produto. O trabalho teve como objetivo realizar contagem e isolamento de bactérias mesófilas presentes em leite cru de três regiões do estado do Maranhão – Brasil, avaliar a capacidade proteolítica e lipolítica das cepas isoladas e identificá-las geneticamente. Para isso, foram coletadas 10 amostras de leite cru em propriedades leiteiras, e bactérias mesófilas foram cultivadas utilizando-se Petrifilm AC™ (37°/48h). A avaliação das atividades proteolítica e lipolítica foi realizada através de semeadura em ágar leite e ágar tributirina (32°/48h) respectivamente, sendo as cepas deteriorantes agrupadas e identificadas geneticamente. Os resultados mostraram que duas (40%) amostras apresentaram contagens acima de 600 mil UFC/mL padrão legal determinado à época, pela IN 62 para contagem de bactérias aeróbias mesófilas e não houve diferença significativa entre as contagens, quanto a refrigeração do leite. Do total de isolados (1.102 cepas), foram identificadas geneticamente 166 (15,06%) cepas puras deteriorantes sendo 120 (72,28%) com atividade lipolítica, 27 (16,26%) proteolíticas; e 19 (11,44%) tanto proteolíticas como lipolíticas. Não houve diferença significativa quanto ao número de cepas deteriorantes e a refrigeração do leite. A identificação genética das cepas, através da amplificação parcial do gene 16S rRNA, mostrou predominância de *Klebsiella* sp. com 95 (57,22%), seguida da bactéria *Acinetobacter* sp. com 19 (11,44%) cepas, *Pseudomonas aeruginosa* com 13 (7,83%), *Staphylococcus epidermidis* com 7 (4,21%), *Pseudomonas* sp. com 6 (3,61%), *Streptococcus dysgalactiae* com 5 (3,01%), *Bacillus* sp. com 4 (2,40%) *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis* com 3 (1,80%) cepas, *Acinetobacter baumannii*, *Empedobacter falsenii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp. e *Microbacterium* sp. com duas (1,20%) cepas cada e *Acinetobacter septicus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Brevibacillus* sp. e *Staphylococcus* sp. com uma (0,60%) cepa cada. A microbiota deteriorante presente foi em sua maioria lipolítica seguida por micro-organismos proteolíticos e por fim, lipolíticos e proteolíticos simultaneamente.

Palavras-chave: PCR; microbiota deteriorante; qualidade; microbiologia.

MICROBIOTA MESOPHILIC PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC IN REGIONS OF MILK MARANHÃO STATE – BRAZIL

ABSTRACT

The mesophilic microorganisms are of great importance for the assessment of the microbiological quality of raw milk for hygiene indicate faults in the production process. The amount of mesophilic microorganisms in milk is related to the life of the product. The study aimed to carry out counting and isolation of mesophilic aerobic bacteria present in raw milk from three regions of the state of Maranhão - Brazil, to evaluate the proteolytic capacity and lipolytic of the strains and identify them genetically. For this, we collected 10 samples of raw milk in dairy farms, and mesophilic bacteria were cultured using Petrifilm AC™ (37 ° / 48h). The evaluation of proteolytic and lipolytic activities was performed by seeding on agar milk and tributyrin agar (32 ° / 48h) respectively being grouped and identified genetically spoilage strains. The results showed that two (40%) samples showed counts above 600 000 CFU / mL standard cool determined at the time, the IN 62 to count mesophilic bacteria and there was no significant difference between the scores, the cooling of milk. Of total isolates (1,102 strains) were we identify genetically 166 (15.06%) pure strains spoilage and 120 (72.28%) with lipolytic activity, 27 (16.26%) proteolytic; and 19 (11.44%) both proteolytic and lipolytic. There was no significant difference in the number of spoilage strains and cooling of milk. The identification of genetic strains by partial 16S rRNA gene amplification showed predominance of *Klebsiella* sp. 95 (57.22%), then the bacteria *Acinetobacter* sp. 19 (11.44%) of the strains, *Pseudomonas aeruginosa* with 13 (7.83%), *Staphylococcus epidermidis* with 7 (4.21%), *Pseudomonas* sp. 6 (3.61%), *Streptococcus dysgalactiae* with 5 (3.01%), *Bacillus* sp. 4 (2.40%) *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 3 (1.80%) strains, *Acinetobacter baumannii*, *Empedobacter falsenii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp. and *Microbacterium* sp. with two (1.20%) strains each and *Acinetobacter septicus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Brevibacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. with a (0.60%) strain each. The microbiota marring this was mostly lipolytic followed by proteolytic microorganisms and finally, lipolytic and proteolytic simultaneously.

Key words: PCR; deteriorating microbiota; quality; microbiology.

Introdução

Micro-organismos mesófilos apresentam temperatura ótima de crescimento entre 25° e 40°C. Considerando que as temperaturas no Brasil estão acima de 20°C a maior parte do ano, pode-se dizer que este grupo de bactérias tem seu desenvolvimento favorecido no país (BELOTI, 2015).

A análise laboratorial mais utilizada para monitorar a qualidade microbiológica do leite cru é a contagem padrão em placas de micro-organismos aeróbios mesófilos, que representa a contaminação total que o leite sofreu até o momento da coleta da amostra e reflete falhas de higiene nos processos de produção (CHAMBERS, 2002).

Para controlar a microbiota mesófila e processo de acidificação decorrente da degradação da lactose, é que a Instrução Normativa 51 (Brasil, 2002) e Instrução Normativa 62 (Brasil, 2011) determinam que o leite cru seja refrigerado na propriedade leiteira. Pesquisadores observaram que esta medida de fato reduziu consideravelmente as contagens de bactérias aeróbias mesófilas no leite (SANTANA et al., 2001; PINTO et al., 2006). Entretanto, observou-se que a refrigeração do leite na propriedade leiteira proporcionou a adaptação das bactérias mesófilas e a produção de enzimas termoestáveis proteolíticas e lipolíticas, resultantes do seu metabolismo psicrotrófico (PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2008; NORBERG et al., 2010).

A atividade lipolítica e/ou proteolítica reduz a vida útil do leite e derivados e interfere nas características sensoriais, diminuindo o rendimento na produção de derivados (Celestino et al., 1997; Chen et al., 2003) e implicando em perdas econômicas significativas para a indústria de laticínios.

O trabalho teve como objetivo quantificar e identificar geneticamente as bactérias aeróbias mesófilas proteolíticas e lipolíticas presentes no leite cru de regiões do estado do Maranhão – Brasil.

Material e Métodos

Perfil das propriedades

As amostras foram coletadas entre os meses de setembro e outubro de 2014, em dez propriedades de municípios do estado do Maranhão, sendo quatro localizadas na região do Mearim, centro norte do estado, quatro na região dos Cocais, centro leste do estado, e duas na região do Médio Parnaíba, leste do estado. Cerca de quatro propriedades apresentavam número de vacas ≤ 100 , cinco entre 101 e 200 vacas e uma apresentava >200 vacas. Quanto ao número de animais em lactação, cinco propriedades apresentavam ≤ 50 vacas em lactação e cinco apresentavam entre 51 e 100 vacas em lactação. Em relação a produção diária duas propriedades produziam até 100 litros de leite, cinco produziam entre 101 e 500 litros e três produziam mais que 500 litros de leite diariamente. A alimentação dos animais consistia em capim, cana-de açúcar, milho, mandioca, soja e sal mineral, variando entre as propriedades. Metade das propriedades armazenava o leite em tanque de expansão individual e a outra metade destinava o leite à comercialização logo após a ordenha, sem refrigeração. Todas possuíam ordenha mecanizada em sistema semi-fechado e a água de abastecimento era proveniente de poço artesiano próprio. As propriedades selecionadas foram aquelas localizadas a menos de 4 horas do laboratório onde as análises foram realizadas.

Coleta de amostras

Foram coletadas amostras na quantidade de 500 mL de cada propriedade, utilizando concha esterilizada e frascos estéreis, que foram transportados em caixa isotérmica contendo gelo, até o laboratório de microbiologia do IFMA Campus Caxias, Caxias-MA onde foram realizadas as análises. Nas propriedades que refrigeravam o leite foi verificada e registrada a temperatura do leite no tanque, antes da coleta.

Contagem de micro-organismos mesófilos

Para a contagem de bactérias mesófilas foi utilizado o sistema Petrifilm AC™ (3M Microbiology, St. Paul, MN) (Morton, 2001), incubando as amostras a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas após diluições decimais em solução salina peptonada.

Avaliação da atividade proteolítica e/ou lipolítica

Todas as colônias de bactérias aeróbias mesófilas que cresceram nas placas de Petrifilm AC foram testadas quanto a atividade proteolítica e lipolítica. Após a contagem todas as colônias foram repicadas para ágar leite (*Acumedia, Baltimore, USA*), suplementado (9:1) com solução de leite em pó desnatado reconstituído (10%) e para ágar tributirina (*Himedia, Mumbai, India*) suplementado (99:1) com tributirina (*Himedia, Mumbai, India*) e incubadas a 32°C por 48 horas para verificação da atividade proteolítica (BEERENS; LUQUET, 1990) e lipolítica (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007), respectivamente. As cepas foram consideradas positivas para proteólise e/ou lipólise, conforme apresentassem a formação de halos translúcidos em torno das colônias, nos meios específicos.

Identificação Molecular

Extração do DNA

A identificação molecular das cepas foi realizada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina – PR (UEL). Para a extração do DNA foi utilizada a técnica da fervura, que consistiu em suspender 1 mL do caldo de cultura em tubo de centrifugação descartável de 2 mL livre de DNase e RNase, pirogênico e centrifugados a 14.500 rpm por 5min a 4°C . Em seguida descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μl de TE [Tris-HCl (10MM): EDTA (1mM)] ao palet, e em seguida agitado em vortex. Feito isso, os tubos foram incubados em banho de ebulição onde permaneceram por 15min. Após esse tempo, foram imediatamente imersos em banho de gelo pelo mesmo período. Finalizada esta etapa, os tubos foram levados novamente a

centrifuga a 14.000 rpm por 5min a 4°C. Então, o sobrenadante foi recolhido na quantidade de 100 µl e transferido para um eppendorf estéril, livre de DNase e RNase, e estocado a -20°C para análises posteriores.

Amplificação do gene 16 rRNA

A amplificação parcial do gene 16S rRNA por Polymerase Chain Reaction (PCR) foi realizada utilizando-se os primers Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAAC-GCTGGCGGC-3') e Y3 (5'-CTGACCCCACTTC-AGCATTGTTCCAT-3'), anteriormente descritos por Chen et al. (2000). A reação foi realizada com 0,5 µL de amostra (50 ng/mL), 19,5 µL de água ultrapura esterilizada; 0,5 µL de dNTPs (10 mmol L⁻¹ de cada); 2,5 µL de tampão 10X; 0,75 µL de MgCl₂ (50 mmol L⁻¹); 0,5 µL de cada primer (Y1 e Y3, na concentração de 20 pmol µL⁻¹); 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹), com volume final de 25 µL, e realizada em termocilador (Aeris™ Thermal Cyclor, Esco® Micro Pte, Singapore) utilizando-se desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Young et al. (1991) com modificações.

Para visualização do resultado da PCR das amostras amplificadas, utilizou-se gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 1 hora a uma tensão constante de 5 V/cm². Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,2 µg/mL por 20 minutos e lidos em transiluminador UV.

Restrição enzimática e agrupamento

Foram selecionadas duas enzimas de restrição para facilitar o agrupamento e conseqüentemente a seleção dos exemplares que seriam sequenciados. As enzimas foram Cfo I e Taq I, utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Para Cfo I (Promega) foi preparado um mix constituído por 18µl da enzima, 18 µl de solução tampão e 144 µl de água milli-Q. Em seguida a reação foi preparada, em eppendorf, composta por 4 µl da amostra amplificada de cada bactéria com 4µl do mix preparado. A reação foi realizada no mesmo termociclador, utilizando-se 37°C por 15 minutos e 65°C por 20 minutos.

Quanto a enzima Taq I (Ludwig) foi preparado um mix constituído por 9 µl da enzima, 18 µl de solução tampão e 123 µl de água milli-Q. A reação foi preparada da mesma forma que para a enzima Cfo I e utilizando-se 65°C por 15 minutos e 80°C por 20 minutos. Após o processo no termociclador as amostras foram corridas em gel de agarose 2,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 1 hora a uma tensão constante de 5 V/cm². Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,2 µg/mL por 20 minutos e lidos em transiluminador UV, as imagens foram capturadas para utilização na etapa de agrupamento.

As imagens capturadas após o processo de restrição enzimática foram analisadas no programa de bioinformática BioNumerics 7.5. Os exemplares de cada grupo de bactérias foram analisados, comparados e agrupados a partir de características comuns entre as bandas, gerando um dendrograma. Selecionou-se um exemplar de cada grupo formado para ser sequenciado. A seleção do representante de cada grupo deu-se a partir da melhor qualidade de banda verificada nas imagens da PCR das cepas.

Sequenciamento de DNA

A purificação do DNA amplificado para sequenciamento foi realizada através do PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e a quantificação em Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante. Para reação de sequenciamento em ambas as direções foram utilizados 5 µL da amostra de DNA (10 ng/mL), 1 µL do primer 27f (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (10 pmol), 1 µL do primer 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (10 pmol) (OSBORNE et al., 2005), 2 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,5 µL de tampão TBE 10X e 0,5 µL de água ultra pura em sequenciador automático de DNA (ABI 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) pelo método de Sanger, com temperatura de anelamento de 55°C.

A análise de qualidade das sequências foi realizada através do eletroferograma gerado pelo software BioEdit (Ibis Bio-sciences, Carlsbad, CA, USA) e o agrupamento filogenético pelo software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram comparadas com o banco de dados do GeneBank do National Center for Biotechnology Information utilizando-se da ferramenta "BLAST Search".

Análise estatística

Para as análises estatísticas dos dados de contagem bacteriana foi realizado o teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o Software Excel versão 2010.

Resultados e discussão

Os resultados para as contagens de bactérias aeróbias mesófilas em UFC/mL e análises estatísticas estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1- Contagem de micro-organismos mesófilos de amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado coletados de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014

Leite Refrigerado (UFC/mL)		Leite Não Refrigerado (UFC/mL)	
1	$1,3 \times 10^5$	1	$5,8 \times 10^4$
2	$5,6 \times 10^4$	2	$1,9 \times 10^5$
3	$1,0 \times 10^6$	3	$4,0 \times 10^5$
4	$8,0 \times 10^5$	4	$1,6 \times 10^4$
5	<100	5	$6,0 \times 10^5$
Média	$3,74 \times 10^{5A}$	Média	$2,53 \times 10^{5A}$
Mínimo	<100	Mínimo	$1,6 \times 10^4$
Máximo	$1,0 \times 10^6$	Máximo	$6,0 \times 10^5$

^A Valores seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem entre si no teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: próprio autor.

Os valores para contagem de micro-organismos mesófilos no leite cru refrigerado variaram de <100 a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e no leite cru não refrigerado de $1,6 \times 10^4$ a $6,0 \times 10^5$ UFC/mL. De acordo com o padrão exigido pela IN 62 para contagem bacteriana total em leite cru refrigerado, duas (40%) amostras não atenderam os parâmetros mínimos de qualidade ($6,0 \times 10^5$ UFC/mL), em vigor no momento das coletas, com contagens de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e $8,0 \times 10^5$ UFC/mL (Tab.1).

Lacerda et al. (2010) avaliando a qualidade do leite cru de três municípios do estado do Maranhão verificaram que 65% das amostras apresentavam contagens bacterianas em desacordo com IN 51 (Brasil, 2002) no período seco, atribuindo as elevadas contagens às falhas no manejo, principalmente em relação aos cuidados higiênicos e sanitários na ordenha.

Mattos et al. (2010) também na região nordeste, encontraram em sua pesquisa 83% das amostras acima dos padrões exigidos pela legislação, com

médias de contagens de $1,6 \times 10^7$ UFC/mL, sendo que, no período de sua pesquisa, a legislação determinava padrão de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Já Alfonzo et al. (2012) em seu estudo realizado na região oeste do Paraná encontraram 83,33% das amostras de leite de acordo com a IN 62 para contagem de bactérias aeróbias mesófilas.

A legislação determina a refrigeração do leite, portanto 50% das propriedades estudadas não atenderam a legislação. Apesar disso, todas as amostras estavam dentro dos padrões. Entretanto, não foi observada diferença significativa ($p = 0,25$) entre a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos presentes no leite refrigerado e não refrigerado.

Estes resultados justificam-se pelo fato de que as amostras coletadas de leite cru refrigerado eram provenientes de leites armazenados por até três dias, e em temperaturas que não obedeciam à legislação, estando entre 10 e 12°C. Já o leite cru não refrigerado era entregue todos os dias ao laticínio, e foi amostrado do tanque de armazenamento, ao final da ordenha. O tempo entre a coleta e as análises das amostras não ultrapassou 4 horas. Logo, os micro-organismos presentes no leite não refrigerado tinham menos tempo para multiplicarem-se. Desta forma, a contaminação nas amostras não refrigeradas pode ser considerada alta.

Pinto et al. (2006), verificaram em seu estudo que a qualidade do leite cru está relacionada, entre outras características, ao grau de contaminação inicial e ao binômio temperatura/tempo do resfriamento em que o leite permanece armazenado até o seu processamento. Silva et al. (2011) verificaram que a principal causa de comprometimento da qualidade microbiológica do leite é a ausência ou emprego inadequado de boas práticas de higiene na ordenha.

Os resultados da avaliação das cepas isoladas, quanto a atividade deteriorante do leite cru em relação à sua refrigeração, estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 - Número e percentual de cepas deteriorantes isoladas de bactérias aeróbias mesófilas de amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado coletadas em propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014

			Proteolíticas	Lipolíticas	Prot/Lipo	Total
			n (%)			
Total de cepas isoladas	1.102	CR	8(9,19)	63(72,41)	16(18,39)	87(52,40) ^A
		SR	19(24,05)	57(72,15)	3(3,70)	79(47,59) ^A
Total de cepas identificadas			27(16,26)	120(72,28)	19(11,44)	166(15,06)

*CR e SR representam o leite com refrigeração e sem refrigeração respectivamente.

^AValores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si no teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: próprio autor.

Das amostras avaliadas quanto à população de aeróbios mesófilos, isolou-se 1.102 cepas, e todas foram testadas quanto à atividade deteriorante proteolítica e lipolítica do leite. Como resultado obteve-se 166 (15,06%) cepas deteriorantes, percentual inferior ao encontrado por pesquisadores em outras regiões do Brasil. Catanio et al. (2012) encontraram 95% da população bacteriana isolada, apresentando atividade deteriorante proteolítica e/ou lipolítica em amostras de leite coletadas no norte do Paraná. Em regiões dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, Arcuri et al. (2008) encontraram todos os isolados apresentando atividade proteolítica e/ou lipolítica no leite cru.

Das 166 cepas puras e deteriorantes isoladas, 120 (72,28%) apresentaram atividade lipolítica, 27 (16,26%) proteolíticas; e 19 (11,44%) proteolíticas e lipolíticas simultaneamente. Observou-se, portanto, um maior número de cepas com atividade lipolítica (Tab. 2).

Além disso, 87 (52,40%) foram isoladas de amostras de leite refrigerado e 79 (47,59%) isoladas de amostras de leite sem refrigeração. Não foi observada diferença significativa ($p = 0,37$) entre o total de bactérias deteriorantes presentes no leite refrigerado e não refrigerado (Tab. 2).

O metabolismo proteolítico e lipolítico é mais intenso quando o leite está sob refrigeração (WALSTRA et al., 2001). Desta forma, os achados quanto à atividade deteriorante do leite pelos micro-organismos isolados no presente estudo, podem estar relacionados ao fato de que as propriedades não cumpriam as exigências da IN 62 quanto à refrigeração do leite cru.

Os micro-organismos deteriorantes foram identificados através da reação de PCR, pela qual foi possível verificar o produto de 1500 pb do par de primers Y1 e Y3 de todas as estirpes bacterianas testadas.

A partir do agrupamento realizado foram sequenciadas 26 cepas. Todas foram identificadas com percentual de identidade de 100% a partir da comparação com dados do GenBank.

Tabela 3 – Cepas de bactérias mesófilas proteolíticas e/ou lipolíticas identificadas por sequenciamento genético, e total de cepas análogas do grupo, isoladas do leite cru de três regiões do estado do Maranhão entre setembro e outubro de 2014

Bactérias	Cepas	Total
	identificadas	de cepas do grupo
	n (%)	n (%)
Espécies (8)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (3,84)	13 (7,83)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (3,84)	7 (4,21)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (7,69)	5 (3,01)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 (7,69)	2 (1,20)
<i>Empedobacter falsenii</i>	2 (7,69)	2 (1,20)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (3,84)	2 (1,20)
<i>Acinetobacter septicus</i>	1 (3,84)	1 (0,6)
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	1 (3,84)	1 (0,6)
Gêneros (8)		
<i>Klebsiella sp.</i>	1 (3,84)	95 (57,22)
<i>Acinetobacter sp.</i>	2 (7,69)	19 (11,44)
<i>Pseudomonas sp.</i>	4 (15,38)	6 (3,61)
<i>Bacillus sp.</i>	3 (11,53)	4 (2,40)
<i>Chryseobacterium sp.</i>	1 (3,84)	2 (1,20)
<i>Microbacterium sp.</i>	1 (3,84)	2 (1,20)
<i>Brevibacillus sp.</i>	1 (3,84)	1 (0,6)
<i>Staphylococcus sp.</i>	1 (3,84)	1 (0,6)
Subespécie (1)		
<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	1 (3,84)	3 (1,80)
Total	26	166

Fonte: próprio autor.

Foi realizada a equivalência entre o número de cepas identificadas e o número de cepas integrantes de cada grupo (Tab. 3) e foi observado que o maior número de cepas correspondeu à bactéria *Klebsiella sp.*, com 95 cepas, 57,22% do total de cepas deteriorantes isoladas. Em seguida a bactéria *Acinetobacter sp.* com 19 (11,44%) cepas identificadas quanto ao gênero. Somando-se as cepas em que

chegou-se a identificação da espécie, o gênero *Acinetobacter* totalizou 22 cepas (13,25%) e a terceira bactéria com maior número de cepas foi *Pseudomonas aeruginosa*, com 13 (7,83%) cepas identificadas quanto à espécie. Somando-se as cepas identificadas até o nível de gênero *Pseudomonas* sp., obteve-se 19 cepas (11,44%). Outras 14 bactérias foram identificadas conforme mostra a tabela 3.

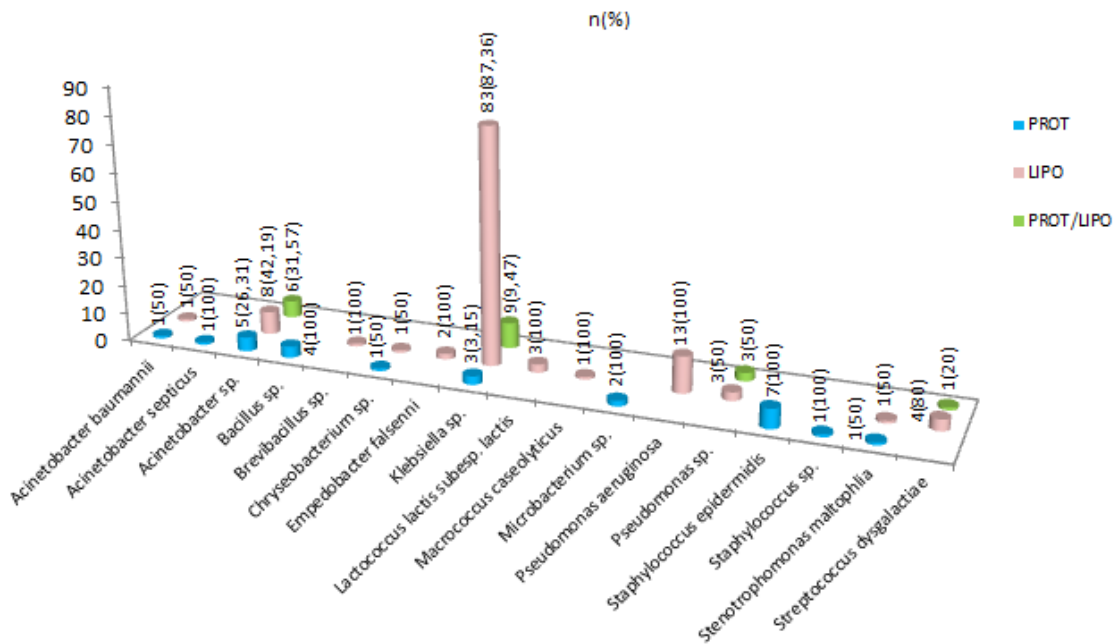


Figura 4 - Frequência n(%) de cepas proteolíticas e/ou lipolíticas de cada bactéria identificada, isoladas de leite cru de três regiões do estado do Maranhão entre setembro e outubro de 2014. Fonte: próprio autor.

Das 95 cepas de bactérias determinadas como *Klebsiella* sp., 83 (87,36%) apresentavam atividade lipolítica, nove (9,47%) apresentavam atividade proteolítica e lipolítica simultaneamente e três (3,15%) proteolítica. Das 19 cepas identificadas como *Acinetobacter* sp. oito (42,19%) eram lipolíticas, seis (31,57%) tanto proteolítica como lipolítica e cinco (26,31%) proteolíticas. Quanto as espécies identificadas deste gênero *A. baumannii* apresentava uma cepa com atividades proteolítica e uma com atividade lipolítica e *A. septicus* uma cepa proteolítica. As 13 cepas determinadas como *Pseudomonas aeruginosa*, (100%) apresentavam atividade lipolítica. Das cepas identificadas somente até este gênero três (50%) eram proteolíticas e três (50%) lipolíticas e lipolíticas simultaneamente. As demais cepas, identificadas no presente estudo com semelhança genética em menor

número com cepas depositadas no GenBank, apresentavam atividade deteriorante conforme a figura 4.

A análise filogenética (Figuras 5 e 6) mostrou diversidade nas cepas de bactérias aeróbias mesófilas deteriorantes isoladas, que foram compatíveis com diferentes cepas depositadas quando se comparou sequencias do gene 16S rRNA.

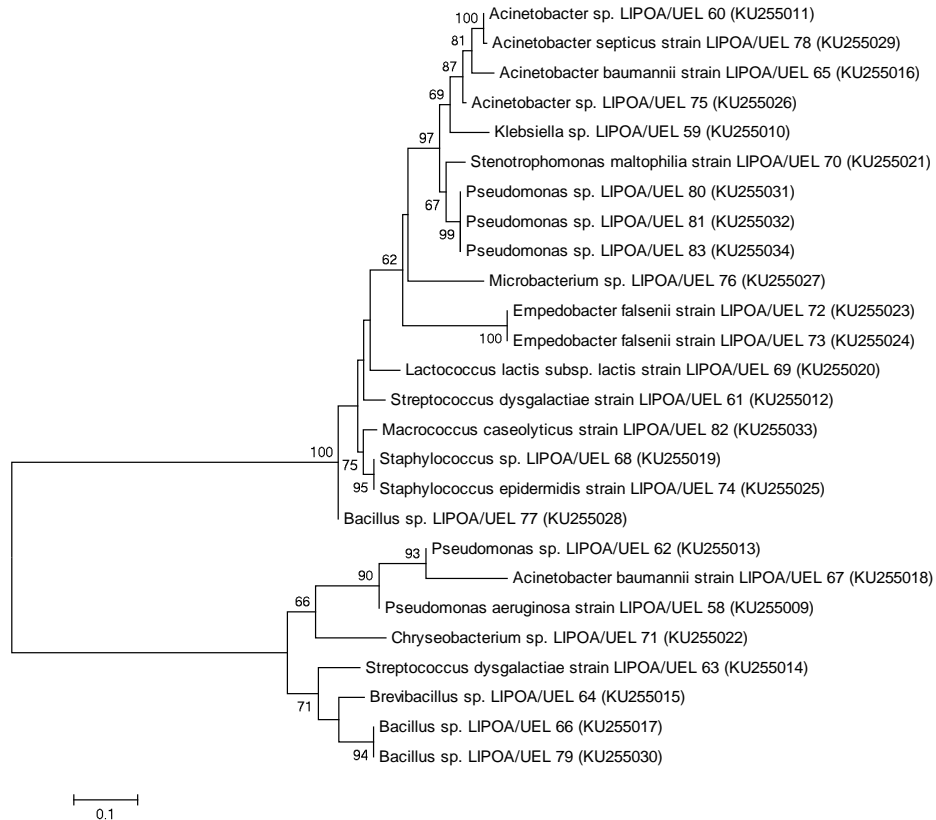


Figura 5 - Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 334 pb do 16S rDNA de bactérias aeróbias mesófilas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,1% substituição de nucleotídeos.

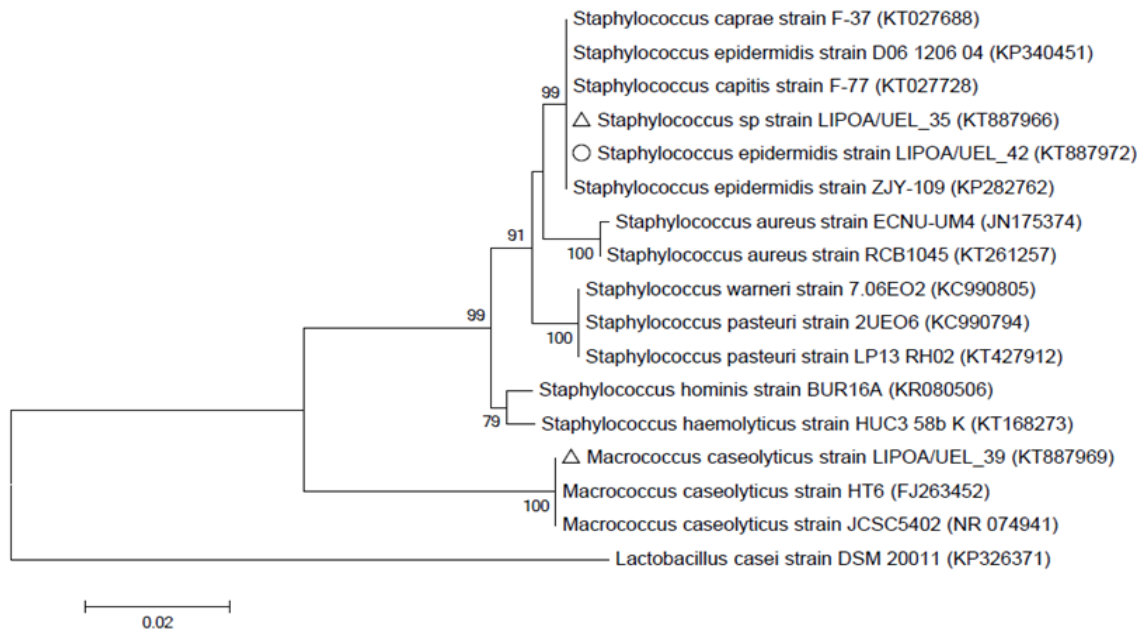


Figura 6- Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 334 pb do 16S rDNA de bactérias aeróbias mesófilas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,02% substituição de nucleotídeos. As estirpes identificadas neste estudo estão marcadas com símbolos ○ e Δ.

Todos os gêneros bacterianos identificados no presente estudo, têm atividade proteolítica e/ou lipolítica descrita no leite, com exceção da bactéria *Empedobacter falsenii*. Entretanto, as espécies identificadas ainda não haviam sido isoladas como microbiota deteriorante do leite no Brasil.

A bactéria *Klebsiella*, isolada em maior número no presente estudo, é Gram negativa e faz parte da família Enterobacteriaceae. É eliminada nas fezes e pode contaminar a água e o solo (QUINN et al., 2005), além de ser um agente infeccioso causador de mastite (PODDER et., 2014). Foi isolada como bactéria deteriorante do leite cru no Brasil por Arcuri et al. (2008), Perin et al. (2012), Pinto et al. (2015) e Nornberg et al. (2010). É reconhecido como psicrotrófico. Sua presença no leite cru indica falta de higiene ou higienização precária no ambiente de ordenha (BELOTI, 2015).

O gênero *Acinetobacter* reúne espécies Gram-negativas e não-fermentadoras, comuns na natureza (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996). Resistem ao uso de desinfetantes como clorexidina e fenóis (Gallego; Towner, 2001) e também ao calor de 50°C a 75°C (JAIN; DANZINGER, 2004). Além de resistirem a

várias classes de antibióticos (GURUNG et al., 2013). A espécie *Acinetobacter baumannii* emergiu como um importante agente patogênico, causando infecções em pacientes graves em unidades de terapia intensiva (Villegas; Hartestein, 2003), assim como, a espécie *A. septicus* (KILIC et al., 2008). Este gênero já foi isolado como deteriorante do leite cru no Brasil por Arcuri et al. (2008), Pinto (2004) e Perin et al. (2012).

As espécies bacterianas mais isoladas como deteriorantes do leite em pesquisas nacionais e internacionais são do gênero *Pseudomonas* que é um relevante responsável pela deterioração do leite (CHEN et al., 2003). *Pseudomonas spp.* têm alta diversidade genética e versatilidade metabólica, o que lhes permite sobreviver em diferentes ambientes, inclusive dutos, tanques de expansão máquinas de ordenha e ambientes de produção animal (SIMÕES et al., 2010). As espécies *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *P. putida* são as principais encontradas na cadeia de lácteos e produzem enzimas proteolíticas resistentes a altas temperaturas causando deterioração até mesmo em produtos lácteos processados (MARCHAND et al., 2009). Além disso, a espécie *P. aeruginosa* secreta também enzimas lipolíticas (ROSENAU et al., 2010).

O gênero *Brevibacillus* assim como o gênero *Bacillus* são importantes deteriorantes do leite pós-pasteurização, devido à possibilidade de resistirem ao processo e por formarem esporos. Segundo Beloti (2015), estudos estimam que 40% das linhagens do gênero *Bacillus* são proteolíticas.

O gênero *Chryseobacterium* reúne espécies Gram-negativas e apresenta atividade proteolítica e lipolítica conhecida em leite cru. Sua capacidade lipolítica foi recentemente investigada e comprovada por Bekker et al. (2016) que detectaram altos níveis de lipólise do leite provocada pela espécie *C. joostei*.

O gênero *Microbacterium* apresenta espécies termodúricas, ou seja, sobrevivem ao processo de pasteurização (WASHAM et al., 1977), estando relacionados à vida útil do leite pasteurizado. Segundo Hantsis-Zacharov; Halpen (2007) *Microbacterium spp.* apresentam elevada atividade proteolítica e lipolítica em leite cru e o monitoramento desta bactéria no leite pode ser usado como um indicador da sua qualidade.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* já foram descritas como integrantes da microbiota deteriorante do leite em diversas pesquisas nacionais e internacionais (ARCURI et al., 2008; PINTO et al., 2015; RAATS et al., 2011;

VARDIER-METZ et al., 2009). Sendo em sua maioria proteolíticas. A espécie *S. epidermidis* é um importante patógeno associado à infecções cardíacas, hospitalares e à mastite bovina. São bastante adaptadas às glândulas mamárias das vacas e parecem usá-la como reservatório de fonte de infecção (PIESSENS et al., 2012, TOMAZI et al., 2014).

A bactéria *Streptococcus dysgalctiae* é Gram-positiva e normalmente isolada do leite de vacas com mastite (SCHUKKEN et al., 2013). Entretanto, sua presença como microbiota proteolítica e/ou lipolítica do leite é pouco relatada.

A identificação da espécie *Empedobacter falsenii* tem especial importância por ter sido isolada recentemente, em 2012, a partir de uma amostra de urina de uma criança com infecção, ainda como *Wautersiella falsenii* por Van der Velder et al. (2012). Traglia et al. (2015) relatam que esta espécie *Empedobacter falsenii* não hidrolisa ou hidrolisa fracamente a caseína.

A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* é uma bactéria Gram-negativa que tem capacidade de formar biofilmes no ambiente industrial e reduzir a vida útil de prateleira do leite por atividades enzimáticas (CLETO et al., 2012). Este gênero foi isolado apresentando atividade lipolítica no leite por Perin et al. (2012).

O gênero *Macrococcus* é intimamente relacionado com o gênero *Staphylococcus* (TSUBAKISHITA et al., 2010). É geralmente isolado a partir da pele e alimentos de origem animal tais como leite e carne. *Macrococcus caseolyticus* tem grande importância por ser resistente a meticilina (BABA et al., 2009).

A bactéria *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* está naturalmente presente no leite e tem papel importante na produção de queijos devido a produção de L-lactato. Contudo, podem contribuir para a proteólise e lipólise do leite reduzindo sua vida útil (SMIT et al., 2005).

Mesmo as bactérias, isoladas no presente estudo, que são facilmente eliminadas através do tratamento térmico, preocupam por terem apresentado atividade enzimática para degradação de proteínas e gorduras do leite, comprometendo seu processo de industrialização. É ainda importante o fato de várias delas serem conhecidos psicrotóxicos, indicando que quando o resfriamento do leite for implantado como se recomenda, há grande chance de adaptação à nova temperatura. Assim, a implantação de boas práticas de higiene na ordenha se faz imprescindível e urgente, para que se consiga melhorar a qualidade do leite.

Conclusões

- ✓ A quantidade de micro-organismos deteriorantes proteolíticos e lipolíticos encontrada no leite das propriedades estudadas, é menor do que a descrita por outros autores em outros Estados.
- ✓ Quanto à atividade deteriorante, as cepas foram predominantemente lipolíticas, seguidas por micro-organismos proteolíticos e por fim, lipolíticos e proteolíticos simultaneamente.
- ✓ A bactéria mesófila deteriorante predominante, no presente estudo, foi *Klebsiella* sp., seguida por *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.
- ✓ A microbiota aeróbia mesófila encontrada no leite das propriedades estudadas, apresentou grande diversidade de gêneros e espécies, contemplando inclusive bactérias ainda não relatadas como deteriorantes do leite no Brasil.

Referências

- ALFONZO, E. P. M.; POZZA, M. S. S.; ZAMBOM, M. A.; COSTA, P. B.; POZAA, P. C.; MADRONA, G. S. Caracterização microbiológica da qualidade do leite coletado em tanques de expansão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 67, 48-52, 2012.
- 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 psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural** 38, 2250-2255, 2008.
- BABA, T., KUWAHARA-RAI, K., UCHIYAMA, I., TAKCUCHI, F., ITO, T., HIRAMATSU, K. Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic Staphylococci. **Journal of Bacteriology** 191, 1180-1190, 2009.
- BEERENS, H., LUQUET, F.M. **Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acríbia S.A. 141p. 1990.
- BEKKER, A.; JOOSTE, P.; STEYN, L.; BOTHMA, C.; HUGO, A.; HUGO, C. Lipid breakdown and sensory analysis of milk inoculated with *Chryseobacterium joostei* or *Pseudomonas fluorescens*. **International Dairy Journal** 52, 101-106, 2016.
- BELOTI, V. Microrganismos de Importância no Leite. In:_____. (Org). **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015. p. 109-221.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. Acinetobacter spp. nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology** 9,148–165. 1996.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 62: Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite

Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo A, tipo B, tipo C e cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 set. 2002, p. 13, Seção 1.

CATANIO, F. S.; INAY, O. M.; SILVA, A. S.; PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; BELOTI, V.; COSTA, M. R.; SOUZA, C. H. B.; AREGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Qualidade do leite cru refrigerado de uma planta de processamento, no norte do Paraná, após a implantação das mudanças impostas pela IN 62 de 2011. **Semina: Ciências Agrárias** 33, 3171-3180, 2012.

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** 7, 129-140, 1997.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. New York: Wiley-Interscience; 2002.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 5099-5103, 2000.

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

CLETO, S., MATOS, S., KLUSKENS, L., VIEIRA, M., KAUFMANN, G. Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant (Contaminants from a Sanitized Milk Plant). **PLOS ONE** 7, 1-8, 2012.

GALLEGO, L.; K. J. TOWNER. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. **Journal Medical Microbiology** 50,71–77, 2001.

GRUNG, M. H. M.; NAM, M. D.; TAMANG, M. H.; CHAE, G. C.; JANG, S. C.; JUNG, S. K. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. **Journal of Dairy Science** 96, 1997-2002, 2013.

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

JAIN, R.; L. H. DANZIGER. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: An emerging challenge to clinicians. **Annals Pharmacotherapy** 38,1449–1459, 2004.

KILIC, A., HAIJING, L., MELLMANN, A., BASUSTAOGU, A. C., KUL, M., ZEYNEP, S., AYDOGAN, H., STRATTON, C. W., HARMSSEN, D., TANG, Y. *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology** 46, 902-908, 2008.

LACERDA, L, M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite de propriedades leiteiras nos municípios de Miranda do Norte, Itapecuru-Mirim e Santa Rita, Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico** 77, 209-2015, 2010.

MARCHAND, S.; HELEY, K.; MESSENS, W.; COUDIJZER, K.; DE VOS, P.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L.; DE BLOCK, J.; HEYNDRICCKX, M. Seasonal influence on heat resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. **Environmental Microbiology** 11, 467-482, 2009.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. 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** 31, 173-182, 2010.
- MORTON. R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C, 2001. Chapter 7, p. 63-67.
- NORNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology** 63, 41-46, 2010.
- OSBORNE, C. A., GALIC, M., SANGWAN, P., JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters** 248, 183–187, 2005.
- PERIN, L.M.; MORAES, P. M.; ALMEIDA, M. V.; NERO, L. A. Interferência de Temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicotróficas, lipolítica e proteolítica de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias** 33, 333-342, 2012.
- PIESSENS, V., S. De VLIEGHER, B. VERBIST, G. BRAEM, A. VAN NUFFEL, L. De VUYST, M. HEYNDRICKX, E. VAN COILLIE. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative staphylococcus species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology** 155, 62–71, 2012.
- PINTO, C. L. O. **Bactérias psicotróficas proteolíticas do leite cru resfriado granelizado usado para produção de leite UHT**. Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, MG, 2004.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 26, 645-651, 2006.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S. G.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 70, 105-116, 2015.

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** 9, 1-5, 2014.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Família Enterobacteriaceae In:_____. (Org). **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.129-130.

RAATS, D., OFFEK, M., MINIZ, D., HALPEN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology** 28, 465-471, 2011.

ROSENAU, F.; ISENHARDT, S.; GDYNIA, A.; TIELKER, D.; SCHMIDT, E.; TIELEN, P.; SCHOBERT, M.; JAHN, D.; WILHELM, S.; JAEGER, K. Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters** 309, 25-34, 2010.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Milk contamination in different points of the process: I) Aerobic mesophilic and psychrotrophic microorganisms. **Semina: Ciências Agrárias** 22, 145-154, 2001.

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**, Londrina, 32, 267-276, 2011.

SIMÕES, M., L. C. SIMÕES; VIEIRA M. J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research** 43, 229–237, 2009.

SCHUKKEN, Y. H., ZURAKOWSKI, M. J., RAUCH, B. J., GROSS, B., TIKOFSKY, L. L., WLCOME, F. L. Noninferiority trial comparing a first-generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastites in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 96, 6763-6774, 2013.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. W. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology** 29, 591-610, 2005.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30, 2725–2729, 2013.

TSUBAKISHITA, S., KUWAHARA-ARAI, K., BABA, T., HIRAMATSU, K. Staphylococcal cassette chromosome *mec*-Like element in *Macrococcus caseolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 54, 1469-1475, 2010.

TOMAZI, T., GONÇALVES, J. L., BARREIRO, J. R., BRAGA, P. A. C., SILVA, L. F. P., EBERLIN, M. N., SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative Staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology** 52, 1658-1663, 2014.

TRAGLIA, G., DIXON, C., CHIEM, K., ALMUZARA, M., Barberis, C., MONTAÑA, S., . . . RAMÍREZ, M. Draft Genome Sequence of *Empedobacter* (Formerly *Wautersiella*) *falsenii* comb. nov. Wf282, a Strain Isolated from a Cervical Neck Abscess. **Genome Announcements** 3, 1-2, 2015.

VAN DER VELDEN, L. B. J.; DE JONG, A. S.; DE JONG, H.; DE GIER, R. P. E.; RENTENAAR, R. J. First report of a *Wautersiella falsenii* isolated from the urine of an

infant with pyelonephritis. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, 74, 404-405, 2012.

VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBES, C.; MONTEL, M.C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk?. **Food Microbiology**, 26, 305-310, 2009.

VILLEGAS, M. V.; A. I. HARTSTEIN. Acinetobacter outbreaks, 1977–2000. **Infection Control Hospital Epidemiology** 24, 284–295, 2003.

WALSTRA. P.; GEURTS, T. J; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL MAIS. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Zaragoza: Acribia; 2001 .

WASHAM, C. J., H. C.; OLSON, E. R.; VEDAMATHU. Heat Resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. **Journal Food Protection** 40,101–108. 1977.

YOUNG, J.P.Y.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51, 89-103, 1991.

5 ARTIGO B

BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS EM LEITE NO ESTADO MARANHÃO - BRASIL: CONTAGEM, ISOLAMENTO, E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DETERIORANTE

RESUMO

Bactérias psicotróficas são importantes deteriorantes do leite, devido à capacidade de se reproduzirem em baixas temperaturas e produzirem enzimas lipolíticas e proteolíticas, de grande parte dos integrantes deste grupo. Têm sido observadas elevadas contagens de bactérias psicotróficas em leite cru, em diversas regiões do Brasil, entretanto, pouco se sabe sobre a identidade das cepas presentes. No Estado do Maranhão, são poucos os dados inclusive sobre contagens deste grupo de bactérias no leite. Esta pesquisa teve como objetivo realizar contagem e isolamento de bactérias psicotróficas presentes no leite cru das regiões centro norte, centro leste e leste do estado do Maranhão - Brasil, avaliar a atividade deteriorante das cepas isoladas e identificá-las geneticamente. Para tanto, foram coletadas 10 amostras de leite cru destas regiões do estado e bactérias psicotróficas foram cultivadas em ágar PCA por semeadura em superfície, incubadas a 7°C por 10 dias. A avaliação das atividades proteolíticas e lipolíticas foi realizada através de semeadura em ágar leite e ágar tributirina respectivamente, incubadas a 32°C por 48 horas. As cepas caracterizadas como psicotróficas deteriorantes foram identificadas geneticamente. Os resultados mostraram baixas contagens de psicotróficos com médias de $7,0 \times 10^3$ UFC/mL (leite refrigerado) e $3,2 \times 10^3$ UFC/ml (leite não refrigerado), não havendo diferença significativa quanto a refrigeração do leite. Foram isoladas 74 cepas, 27 (36,48%) com atividade deteriorante, sendo 17 (62,96%) com atividade lipolítica e 10 (37,03%) tanto atividade proteolítica como lipolítica. Nenhuma cepa apresentou atividade exclusivamente proteolítica. Não foi observada diferença significativa quanto a refrigeração do leite e percentual de bactérias deteriorantes. Quanto à identificação das cepas, 12 cepas (44,44%) foram identificadas como *Enterococcus* sp.; 7 (25,92%) como *Lactococcus garvieae*; 2 (7,40%) como *Bacillus* sp., *Hafnia alvei* e *Pantoea* sp. (cada uma) e uma (3,70%) como *Brevibacillus agri* e *Klebsiella* sp. (cada). As bactérias identificadas são conhecidos deteriorantes do leite, com exceção da bactéria *Lactococcus garvieae* e *Brevibacillus agri*, no Brasil. As baixas contagens de psicotróficos podem indicar que a adaptação das bactérias à refrigeração ainda é insípida. Quanto a microbiota deteriorante foi em maioria lipolítica seguida por proteolítica/lipolítica simultaneamente. Não foram observadas cepas com atividade exclusivamente proteolítica.

Palavras-chave: Refrigeração; microbiota deteriorante; qualidade; genética.

PSYCHROTROPHIC BACTERIA IN MARANHÃO STATE/BRAZIL MILK: SCORE, ISOLATION, DETERIORATING ACTIVITY AND IDENTIFICATION

ABSTRACT

psychrotrophic spoilage of milk are important because of the ability to replicate at low temperatures and produce lipolytic and proteolytic enzymes, much of the members of this group. Have been observed high counts of psychrotrophic bacteria in raw milk, in various regions of Brazil, however, little is known about the identity of these strains. In the state of Maranhão, there are few data on counts including this group of bacteria in milk. This research aimed to carry out counting and isolation of psychrotrophic bacteria present in raw milk from regions north central, east central and eastern state of Maranhao - Brazil, assess the deteriorating activity of the strains and identify them genetically. Therefore, we collected 10 samples of raw milk of these regions of the state and psychrotrophic bacteria were grown on PCA agar by seeding surface, incubated at 7 ° C for 10 days. The evaluation of proteolytic and lipolytic activities was performed by seeding milk agar agar and tributyrin, respectively, incubated at 32 ° C for 48 hours. The strains characterized as deteriorating psychrotrophic were identified genetically. The results showed low counts of psychrotrophic averaging 7,0x10³ CFU / mL (refrigerated milk) and 3,2x10³ CFU / ml (non-refrigerated milk) with no significant difference in the cooling of milk. They were isolated 74 strains, 27 (36.48%) with deteriorating activity, 17 (62.96%) with lipolytic activity and 10 (37.03%) both proteolytic activity as lipolytic. No strain showed only proteolytic activity. There was no significant difference in the cooling of milk and percentage of spoilage bacteria. The identification of strains, 12 strains (44.44%) were identified as *Enterococcus* sp .; 7 (25.92%) as *Lactococcus garvieae*; 2 (7.40%) as *Bacillus* sp., *Hafnia alvei* and *Pantoea* sp. (Each) and one (3.70%) and *Brevibacillus agri* and *Klebsiella* sp. (each). The identified bacteria are known spoilage of milk, with the exception of the bacterium *Lactococcus garvieae* and *Brevibacillus agri*, in Brazil. Low psychrotrophic counts may indicate that the adaptation of bacteria to the cooling is still insipid. As the deteriorating microbiota was most lipolytic followed by proteolytic / lipolytic simultaneously. Strains with only proteolytic activity were observed.

Key words: Cooling; deteriorating microbiota; quality; genetics

Introdução

Bactérias psicotróficas são quase que na sua totalidade, aeróbios mesófilos que têm capacidade de se desenvolverem em temperaturas entre 2°C e 8°C, ativando metabolismos alternativos. Na cadeia do leite as temperaturas, frequentemente, variam entre 4°C e 10°C sem prejuízos do crescimento dos psicotróficos. As vias eficientes de metabolismo que os psicotróficos adotam envolvem proteólise e lipólise, principais problemas microbiológicos do leite refrigerado (BELOTI, 2015).

A atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas pode reduzir a qualidade sensorial e o tempo de comercialização dos produtos lácteos processados (Santos et al., 2003; Oliveira et al., 2000) acarretar problemas tecnológicos no leite UHT, durante a vida útil, diminuir o rendimento na fabricação de derivados como o queijo e comprometer seu aroma e sabor (LAW, 1979).

A refrigeração do leite cru passou a ser exigida a partir a Instrução Normativa nº 51 (IN 51) (BRASIL 2002) e IN 62 (BRASIL 2011) para diminuir as elevadas contagens de mesófilos no leite. Porém, vários pesquisadores têm comprovado que após essa medida houve uma elevação nas contagens de psicotróficos no leite brasileiro (Pinto et al., 2006; Arcuri et al., 2008; Nero et al., 2009; Santos et al., 2009; Mattos et al., 2010; Barreto et al., 2012; Catanio et al., 2012; Perin et al., 2012; Izidoro et al., 2013; Martins et al., 2013; Santos et al., 2013; Beloti et al., 2015). Segundo Arcuri et al. (2008) o número de bactérias psicotróficas presentes no leite cru está relacionado ao tempo e temperatura em que o leite é armazenado, e às condições higiênicas na produção.

Apesar de muitas pesquisas sobre a contagem deste grupo de micro-organismos em leite cru, ainda são poucas as informações, no Brasil, sobre os integrantes da microbiota psicotróficas deteriorante. O objetivo deste trabalho foi realizar contagem e isolamento de bactérias psicotróficas presentes no leite cru das regiões do estado do Maranhão - Brasil, avaliar a atividade deteriorante proteolítica e lipolítica das cepas isoladas e identificá-las geneticamente.

Material e Métodos

Perfil das propriedades

As amostras foram coletadas entre os meses de setembro e outubro de 2014 em dez propriedades de municípios do estado do Maranhão, sendo quatro localizadas na região do Mearim, centro norte do estado, quatro na região dos Cocais, centro leste do estado, e duas na região do Médio Parnaíba, leste do estado. Cerca de quatro propriedades apresentavam número de vacas ≤ 100 , cinco entre 101 e 200 vacas e uma apresentava >200 vacas. Quanto ao número de animais em lactação cinco propriedades apresentavam ≤ 50 vacas em lactação e cinco apresentavam entre 51 e 100 vacas em lactação. Em relação a produção diária duas propriedades produzia até 100 litros de leite, cinco produzia entre 101 e 500 litros e três produziam mais que 500 litros de leite diariamente. A alimentação dos animais consistia em capim, cana-de açúcar, milho, mandioca, soja e sal mineral, variando entre as propriedades. Metade das propriedades armazenava o leite em tanque de expansão individual e a outra metade destinava o leite à comercialização logo após a ordenha, sem refrigeração. Todas possuíam ordenha mecanizada em sistema semi-fechado e a água de abastecimento era proveniente de poço artesiano próprio. As propriedades selecionadas foram aquelas localizadas a menos de 4 horas do laboratório onde as análises foram realizadas.

Coleta de amostras

De cada propriedade foram coletadas duas amostras na quantidade de 500 mL cada, utilizando concha esterilizada e frascos estéreis, que foram transportados em caixa isotérmica contendo gelo, até o laboratório de microbiologia do IFMA Campus Caxias, Caxias-MA onde foram realizadas as análises. Nas propriedades que refrigeravam o leite foi verificada e registrada a temperatura do leite no tanque, antes da coleta.

Contagem de micro-organismos psicrotróficos

O método de contagem utilizado para as bactérias psicrotróficas foi o de Frank; Youssef (2006). As diluições seriadas foram semeadas, na quantidade de 0,1 mL, em superfície de Ágar Padrão para Contagem (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) - PCA com auxílio de alça de Drigalski em duplicata, e, em seguida incubadas a $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}$ por 10 dias.

Avaliação da atividade proteolítica e/ou lipolítica

As colônias de bactérias psicrotróficas isoladas foram repicadas em placas com Ágar Leite (*Acumedia, Baltimore, USA*), suplementado (9:1) com solução de leite em pó desnatado reconstituído (10%) e para ágar tributirina (*Himedia, Mumbai, India*) suplementado (99:1) com tributirina (*Himedia, Mumbai, India*), incubadas a 32°C por 48 horas para verificação da atividade proteolítica (BEERENS; LUQUET, 1990) e lipolítica (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007), respectivamente. As cepas foram consideradas positivas para proteólise e/ou lipólise, conforme apresentassem a formação de halos translúcidos em torno das colônias, nos meios específicos.

Recuperação das cepas e extração do DNA

A identificação molecular das cepas foi realizada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina – PR (UEL). As cepas foram fixadas em lâminas de microscopia óptica para caracterização morfotintorial pela coloração de Gram e inoculadas em placas com ágar PCA e Ágar sangue, incubadas a 35° por 48h, para verificação da pureza. Somente as cepas consideradas puras tiveram seu DNA extraído. Para a extração do DNA foi utilizada a técnica da fervura, que consistiu em suspender 1 mL do caldo de cultura em tubo de centrifugação descartável de 2 mL livre de DNase e RNase, pirogênico e centrifugados a 14.500 rpm por 5min a 4°C . Em seguida descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μl de TE [Tris-HCl (10MM): EDTA (1mM)] ao palet, e em seguida agitado em vortex. Feito isso, os tubos foram incubados em banho de ebulição onde permaneceram por 15min. Após esse tempo, foram imediatamente

imersos em banho de gelo pelo mesmo período. Finalizada esta etapa, os tubos foram levados novamente a centrifuga a 14.000 rmp por 5min a 4°C. Então, o sobrenadante foi recolhido na quantidade de 100 µl e transferido para um eppendorf estéril, livre de DNase e RNase, e estocado a -20°C para análises posteriores.

Amplificação do gene 16 rRNA

A amplificação parcial do gene 16S rRNA por Polymerase Chain Reaction (PCR) foi realizada utilizando-se os primers Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAAC-GCTGGCGGC-3') e Y3 (5'-CTGACCCCACTTC-AGCATTGTTCCAT-3'), anteriormente descritos por Chen et al. (2000). A reação foi realizada com 0,5 µL de amostra (50 ng/mL), 19,5 µL de água ultrapura esterilizada; 0,5 µL de dNTPs (10 mmol L⁻¹ de cada); 2,5 µL de tampão 10X; 0,75 µL de MgCl₂ (50 mmol L⁻¹); 0,5 µL de cada primer (Y1 e Y3, na concentração de 20 pmol µL⁻¹); 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹), com volume final de 25 µL, e realizada em termocilador (Aeris™ Thermal Cycler, Esco® Micro Pte, Singapore) utilizando-se desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Young et al. (1991) com modificações.

Para visualização do resultado da PCR das amostras amplificadas, utilizou-se gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 1 hora a uma tensão constante de 5 V/cm². Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,2 µg/mL por 20 minutos e lidos em transiluminador UV.

Restrição enzimática e agrupamento

Foram selecionadas duas enzimas de restrição para facilitar o agrupamento e conseqüentemente a seleção dos exemplares que seriam sequenciados. As enzimas foram Cfo I e Taq I, utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Para Cfo I (Promega) foi preparado um mix constituído por 18µl da enzima, 18 µl de solução tampão e 144 µl de água milli-Q. Em seguida a reação foi preparada, em eppendorf, composta por 4 µl da amostra amplificada de cada bactéria com 4µl do mix preparado. A reação foi realizada no

mesmo termociclador, utilizando-se 37°C por 15 minutos e 65°C por 20 minutos. Quanto a enzima Taq I (Ludwig) foi preparado um mix constituído por 9 µl da enzima, 18 µl de solução tampão e 123 µl de água milli-Q. A reação foi preparada da mesma forma que para a enzima Cfo I e utilizando-se 65°C por 15 minutos e 80°C por 20 minutos. Após o processo no termociclador as amostras foram corridas em gel de agarose 2,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 1 hora a uma tensão constante de 5 V/cm². Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,2 µg/mL por 20 minutos e lidos em transiluminador UV, as imagens foram capturadas para utilização na etapa de agrupamento.

As imagens capturadas após o processo de restrição enzimática foram analisadas no programa de bioinformática BioNumerics 7.5. Os exemplares de cada grupo de bactérias foram analisados, comparados e agrupados a partir de características comuns entre as bandas, gerando um dendrograma. Selecionou-se um exemplar de cada grupo formado para ser sequenciado. A seleção do representante de cada grupo deu-se a partir da melhor qualidade de banda verificada nas imagens da PCR das cepas.

Sequenciamento de DNA

A purificação do DNA amplificado para sequenciamento foi realizada através do PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e a quantificação em Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante. Para reação de sequenciamento em ambas as direções foram utilizados 5 µL da amostra de DNA (10 ng/mL), 1 µL do primer 27f (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (10 pmol), 1 µL do primer 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (10 pmol) (OSBORNE et al., 2005), 2 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,5 µL de tampão TBE 10X e 0,5 µL de água ultra pura em sequenciador automático de DNA (ABI 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) pelo método de Sanger, com temperatura de anelamento de 55°C.

A análise de qualidade das sequências foi realizada através do eletroferograma gerado pelo software BioEdit (Ibis Bio-sciences, Carlsbad, CA, USA) e o agrupamento filogenético pelo software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). As

sequências foram comparadas com o banco de dados do GenBank do National Center for Biotechnology Information utilizando-se da ferramenta "BLAST Search".

Resultados e discussão

Os resultados para contagens de bactérias psicrotróficas no leite estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Contagem de bactérias psicrotróficas em amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado coletadas de três regiões do estado do Maranhão, nos meses de setembro e outubro de 2014

Leite Refrigerado		Leite Não Resfriado	
1	<10	1	<10
2	1,4x10 ⁴	2	<10
3	<10	3	<10
4	<10	4	6,5x10 ³
5	<10	5	<10
Média	7,0x10 ^{3A}	Média	3,2x10 ^{3A}
Mínimo	<10	Mínimo	<10
Máximo	1,4x10 ⁴	Máximo	6,5x10 ³

^AValores seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem entre si no teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: próprio autor.

Observa-se que 50% das amostras foram de leite não refrigerado. E apenas em duas amostras de leite foi possível obter contagens de bactérias psicrotróficas, sendo uma de amostra de leite refrigerado (1,4x10⁴ UFC/mL) e a outra de amostra de leite não refrigerado (6,5x10³ UFC/mL). Nas demais amostras as contagens foram <10 UFC/mL. Observa-se ainda que, mesmo no leite das duas amostras em que foi possível contabilizar o número de UFC/mL, as contagens foram baixas. Não foi observada diferença significativa ($p = 0,32$) entre a contagem de micro-organismos psicrotróficos presentes no leite refrigerado e não refrigerado.

A IN 62 não estabelece padrão para bactérias psicrotróficas no leite. Entretanto, a presença desse grupo de micro-organismos em concentrações superiores a 10⁶ UFC/mL é correlacionada com a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas (VIDAL et al., 2005).

Os resultados encontrados no presente estudo discordam dos achados de vários pesquisadores (Pinto et al., 2006; Arcuri et al., 2008; Nero et al., 2009; Santos et al., 2009; Mattos et al., 2010; Barreto et al., 2012; Catanio et al., 2012; Perin et al., 2012; Izidoro et al., 2013; Martins et al., 2013; Santos et al., 2013; Beloti et al., 2015) que verificaram contagens elevadas de micro-organismos psicotróficos nas amostras de leite avaliadas, após a determinação da refrigeração do leite pela IN 51 e IN 62.

A obrigatoriedade de resfriamento do leite na propriedade leiteira tem como finalidade controlar o crescimento bacteriano de micro-organismos mesófilos no leite cru. Entretanto, de acordo com Santana et al. (2001) grande parte das bactérias mesófilas têm a capacidade de se adaptarem à nova temperatura, sendo também psicotróficas, o que permite a continuidade de sua multiplicação, conforme observado em seu estudo, em que todas as propriedades estudadas apresentaram elevadas contagens de psicotróficos variando de 5×10^5 UFC/mL a $5,3 \times 10^6$ UFC/mL.

As baixas contagens de bactérias psicotróficas verificadas no presente estudo podem ser atribuídas ao fato de que média anual de temperatura na região é de 33°C , e os meses de setembro e outubro, período de coleta das amostras, são os meses mais quentes do ano nas regiões do estado onde foram adquiridas as amostras, atingindo temperaturas acima de 40°C . Estas temperaturas são inapropriadas para o desenvolvimento espontâneo de psicotróficos no ambiente. Silva et al. (2003) verificou diferenças significativas nas contagens de bactérias psicotróficas, em função do Estado e da estação do ano, obtendo maiores valores nos Estados nos quais as temperaturas eram mais baixas e na estação chuvosa.

Além disso, os leites dos tanques de expansão, avaliados no presente estudo, estavam com temperaturas variando entre 10 e 12°C , temperaturas acima do que exige a IN 62. O não cumprimento da legislação em relação à temperatura do leite no tanque de expansão pode facilitar a adaptação das bactérias mesófilas à temperatura de refrigeração (SANTANA et al., 2001). Segundo Beloti (2015) temperaturas de refrigeração do leite entre 4°C e 10°C ainda permitem o crescimento de psicotróficos.

Quanto à atividade deteriorante dos psicrotróficos no leite cru em relação à presença ou ausência refrigeração, os resultados estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Número e percentual de cepas psicrotróficas deteriorantes em amostras de leite cru refrigerado e não refrigerado, coletadas em propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014

			Proteolíticas Lipolíticas Prot/Lipo Total			
			n (%)			
Total de cepas isoladas	74	CR	0	17(65,38)	9(34,61)	26(36,48) ^A
		SR	0	0	1(100)	1(3,70) ^A
Total de cepas identificadas			0	17(62,96)	10(37,03)	27(36,48)

*CR e SR representam o leite com refrigeração e sem refrigeração respectivamente

^A Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si no teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: próprio autor.

Isolou-se 74 cepas de bactérias psicrotróficas e todas foram testadas quanto à atividade deteriorante do leite. Como resultado obteve-se 27 (36,48%) cepas deteriorantes, destas, 17 (62,96%) apresentaram atividade lipolítica e 10 (37,03%) tanto atividade proteolítica como lipolítica. Nenhuma cepa apresentou atividade exclusivamente proteolítica.

Das 27 cepas psicrotróficas deteriorantes isoladas, 26 (96,29%) foram isoladas do leite com refrigeração e uma (3,70%) do leite sem refrigeração. Não foi observada diferença significativa ($p = 0,11$) entre o total de bactérias deteriorantes presentes no leite refrigerado e não refrigerado. O principal problema relacionado à presença de bactérias psicrotróficas é justamente o fato de, em sua maioria, produzirem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes. A presença destas enzimas no leite diminui sobremaneira a vida útil do leite pasteurizado, mas é especialmente prejudicial para a qualidade do leite UHT devido a sua estocagem em temperatura ambiente por longos períodos, favorecendo a atividade das enzimas (CHEN et al., 2003). Como decorrência, ocorre a sedimentação e geleificação do leite, processo que se inicia ainda dentro dos equipamentos e se agrava durante a vida útil do produto. Também representam grandes perdas econômicas para indústria no processamento de derivados lácteos, como o baixo rendimento na produção de queijos (SANTANA et al, 2004).

A microbiota deteriorante foi identificada através da reação de PCR, pela qual foi possível verificar o produto de 1500 pb do par de primers Y1 e Y3 de todas as estirpes de bactérias psicrotróficas testadas.

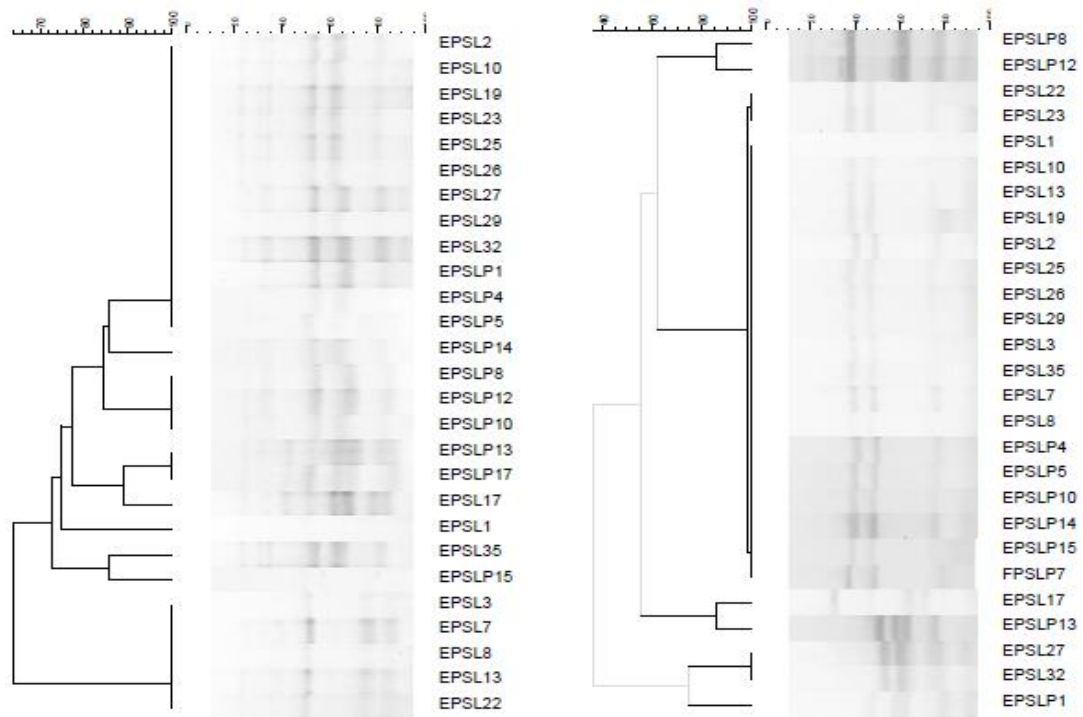


Figura 7 - Dendrogramas construídos por análises de similaridade e agrupamento usando o coeficiente de Dice e UPGMA dos padrões de Polymorphism in the Restriction Fragment Length (RFPL) com uso das enzimas Cfo 1 (esquerda) e Taq 1 (direita) para os perfis genéticos das cepas de bactérias psicrotróficas deteriorantes isoladas de leite cru. Os códigos à direita das figuras representam a identificação das cepas estudadas. Fonte: BioNumerics 7.5.

Os dendrogramas gerados conforme a figura 9 foram comparados para definir um agrupamento final. Como resultado obteve-se 15 cepas para serem sequenciadas. Apenas uma cepa apresentou percentual de identidade de 99 a 100% a partir da comparação com dados do GenBank. Para as demais, o sequenciamento mostrou percentual de identidade de 100% (Tab. 6).

Tabela 6 – 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

Bactérias	Identidade (%) [*]	Cepas identificadas n(%)	Total de cepas n(%)	Atividade deteriorante
Espécies (3)				
<i>Lactococcus garvieae</i>	99-100	3(20,00)	7 (25,92)	6 lipo/ 1 prot-lipo
<i>Hafnia alvei</i>	100	1(6,66)	2 (7,40)	prot-lipo
<i>Brevibacillus agri</i>	100	1(6,66)	1 (3,70)	prot-lipo
Gêneros (4)				
<i>Enterococcus sp.</i>	100	5(33,33)	12 (44,44)	9 lipo/3 prot-lipo
<i>Bacillus sp.</i>	100	2(13,33)	2 (7,40)	prot-lipo
<i>Pantoea sp.</i>	100	2(13,33)	2 (7,40)	lipo
<i>Klebsiella sp.</i>	100	1(6,66)	1 (3,70)	prot-lipo
Total		15	27	

*Identidade baseada no percentual de alinhamento da sequência obtida pelo presente estudo com as depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Fonte: próprio autor.

Foi realizada a equivalência entre o número de cepas identificadas e o número de cepas integrantes de cada grupo (Tab. 6). As cepas deteriorantes isoladas no presente estudos apresentaram semelhança genética a três espécies diferentes. Sendo elas *Lactococcus garvieae* com o maior número de cepas, sete (25,92%), sendo seis lipolíticas e uma proteolítica e lipolítica simultaneamente; *Hafnia alvei*, com duas (7,40%) cepas proteolíticas e lipolíticas simultaneamente e, *Brevibacillus agri*, com uma cepa, sendo esta proteolítica e lipolítica simultaneamente.

As demais cepas foram identificadas a nível de gênero, totalizando quatro gêneros bacterianos diferentes. O gênero *Enterococcus* predominou com 12 (44,44%) cepas do total de deteriorantes. Destas, nove eram cepas lipolíticas e três proteolíticas e lipolíticas simultaneamente. Duas cepas (7,40%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo proteolíticas e lipolíticas simultaneamente, e *Pantoea sp.*, sendo ambas lipolíticas. Uma cepa (3,70%) foi identificada como *Klebsiella*, sendo esta tanto proteolítica como lipolítica no presente estudo.

A análise filogenética (Figura 10 e 11) mostrou diversidade das cepas de bactérias psicrotróficas deteriorantes isoladas, que foram compatíveis com diferentes cepas depositadas, quando se comparou sequências do gene 16S rRNA.

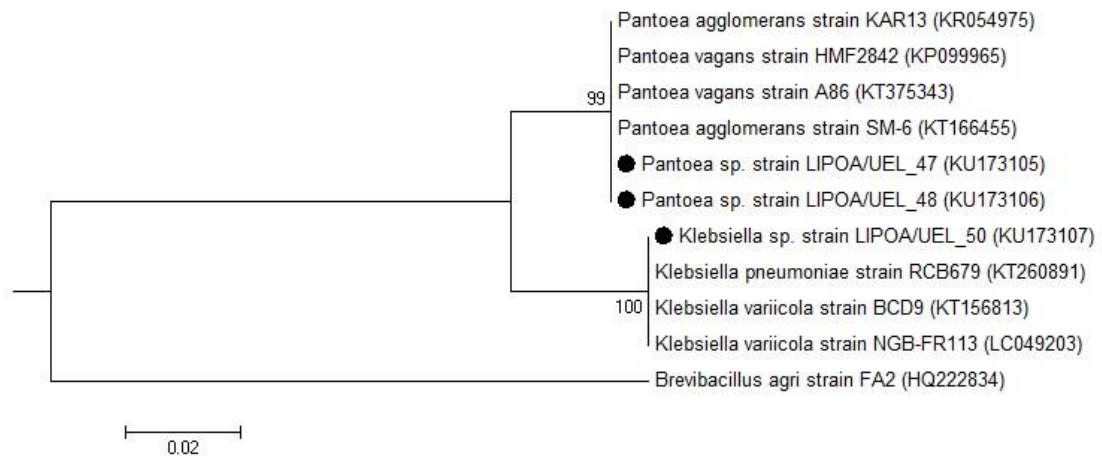


Figura 8 - Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 293 pb do 16S rDNA de bactérias psicotróficas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,02% substituição de nucleotídeos. As estirpes identificadas neste estudo estão marcadas com o símbolo ●.

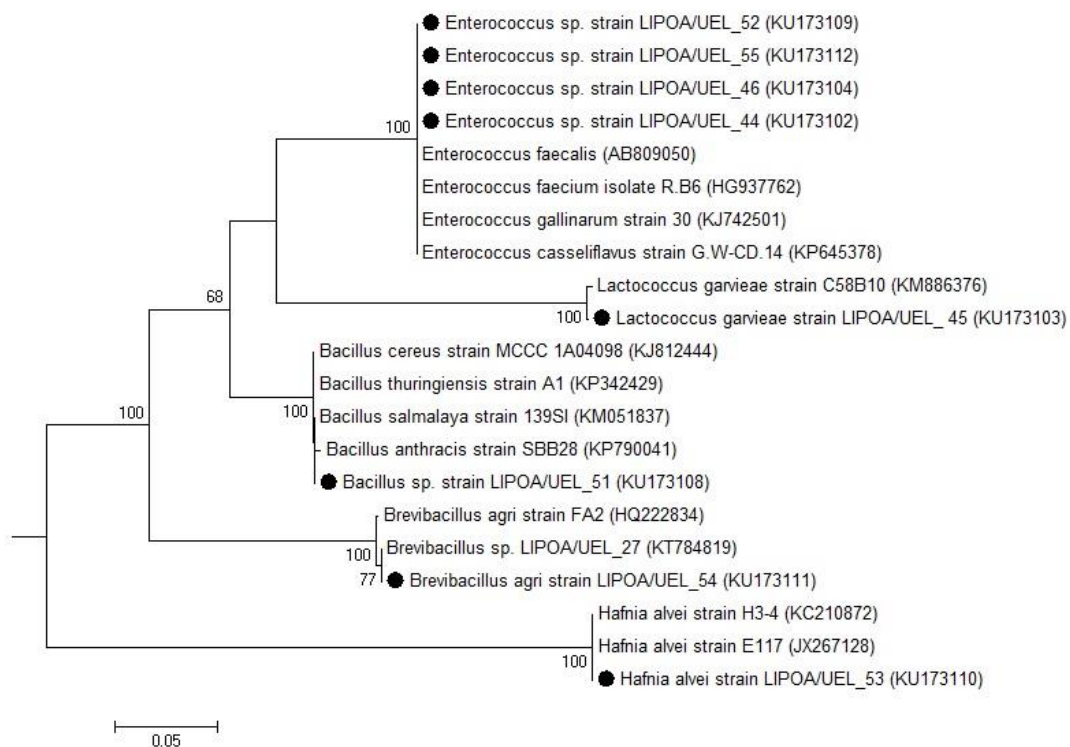


Figura 9 - Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbour-joining baseado no alinhamento de 390 pb do 16S rDNA de bactérias psicotróficas. As amostras (estirpes LIPOA/UEL) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das estirpes reconhecidas considerando o gene 16S rRNA. A distância filogenética está indicada por 0,05% substituição de nucleotídeos. As estirpes identificadas neste estudo estão marcadas com o símbolo ●.

Dentre as espécies identificadas no presente estudo, a bactéria *H. alvei*, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, foi isolada no Brasil, a partir de leite cru refrigerado, por Arcuri et al. (2008) e Pinto et al. (2015). Viana et al. (2009) relatam que esta espécie tem facilidade para formação de biofilmes na indústria de laticínios e, segundo Pinto et al. (2007) ela pode influenciar a deterioração dos alimentos.

Os gêneros *Bacillus*, *Klebsiella* e *Pantoea* foram identificados nas pesquisas de Arcuri et al. (2008) e Pinto et al. (2015). Este último identificou ainda o gênero *Enterococcus* como bactéria psicrófila deteriorante do leite no Brasil. Nornberg et al. (2010) avaliando amostras de leite cru no estado do Rio Grande do Sul, também identificou o gênero *Klebsiella* como deteriorante. As espécies *Lactococcus garvieae* e *Brevibacillus agri* ainda não haviam sido isoladas como microbiota deteriorante do leite no Brasil. Ribeiro Júnior (2015) identificando bactérias esporuladas deteriorantes, isoladas de leite cru refrigerado de propriedades leiteiras do estado do Paraná, isolou, entre outros, os gêneros *Bacillus* e *Brevibacillus*, especialmente importantes na deterioração do leite pós-pasteurização, por resistirem ao processo.

Conclusões

- ✓ As baixas contagens de bactérias psicrófilas podem ser atribuídas à temperatura inadequada de armazenamento do leite, a inexistência de refrigeração ou sua recente implantação nas regiões do estado do Maranhão onde foi realizado o estudo.
- ✓ Quanto à atividade deteriorante, as cepas foram predominantemente lipolíticas, seguidas por micro-organismos lipolíticos e proteolíticos, não se observando micro-organismos exclusivamente proteolíticos.
- ✓ A bactéria psicrófila deteriorante predominante, neste estudo, foi *Enterococcus* sp.
- ✓ A identificação da microbiota psicrófila deteriorante do leite das propriedades estudadas, contemplou bactérias ainda não relatadas como deteriorantes do leite no Brasil.

Referências

- 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 psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural** 38, 2250-2255, 2008.
- BARRETO, N. S. E.; SANTOS, G. C. F.; CREPALDI, A. L.; SANTOS, R. A. R. Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana do leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas, Bhaia. **Sêmima: Ciências Agrárias** 33, 2315-2326, 2012.
- BEERENS, H., LUQUET, F.M. **Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acríbia S.A. 141p. 1990.
- BELOTI, V. Microrganismos de Importância no Leite. In:_____. (Org). **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015. p. 109-221.
- BELOTI, V.; RIBEIRO JR, J. C.; TAMANINI, R.; RAÚJO, J. P. A.; YAMADA, A. K.; ANTÔNIO, N. S. Enumeração de microrganismos psicotróficos e termodúricos psicotróficos de leite: comparação de metodologias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 70, 17-23, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo A, tipo B, tipo C e cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 set. 2002, p. 13, Seção 1.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 62: Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011.

CATANIO, F. S.; INAY, O. M.; SILVA, A. S.; PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; BELOTI, V.; COSTA, M. R.; SOUZA, C. H. B.; AREGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Qualidade do leite cru refrigerado de uma planta de processamento, no norte do Paraná, após a implantação das mudanças impostas pela IN 62 de 2011. **Semina: Ciências Agrárias** 33, 3171-3180, 2012.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 5099-5103, 2000.

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

FRANK, J.F., YOUSEF, A.E. Test for groups of microorganisms. In: Wehr, H.M., Frank, J.K. (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products** (17th ed.) American Public Health Association, Washington, D.C. Chapter 8, Section 8.090 and 8.100, pp. 239–242, 2006.

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

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres** 60, 452-457, 2013.

LAW, B. A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their affects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research** 46, 573-588, 1979.

MARTINS, M. L.; CARVALHAES, J. F.; SANTOS, L. J.; MENDES, N. S.; MARTINS, E. M. F.; MOREIRA, G. I. P. Qualidade do leite cru dos tanques de expansão

individuais e coletivos de um laticínio do município de Rio Pomba, MG – Um estudo de caso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 68, 24-32, 2013.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. 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** 31, 173-182, 2010.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 29, 386-390, 2009.

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

OLIVEIRA, C. A. F.; MESTIERI, L.; SANTOS, M. V.; MORENO, J. F. G.; SPERS, A., GERMANO, P. M. L. Effect of microbiological characteristics of raw milk on the quality of whole milk powder. **Brazilian Journal Microbiology** 31, 95-98, 2000.

OSBORNE, C. A., GALIC, M., SANGWAN, P., JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 248, 183–187, 2005.

PERIN, L.M.; MORAES, P. M.; ALMEIDA, M. V.; NERO, L. A. Interferência de Temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicotróficas, lipolítica e proteolítica de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias** 33, 333-342, 2012.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 26, 645-651, 2006.

PINTO, U. M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control** 18, 1322-1327, 2007.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S. G.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 70, 105-116, 2015.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. **Microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, UEL, Londrina-PR, 71f., 2015.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. et al. Milk contamination in different points of the dairy process. ii) mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. **Semina: Agrárias** 25, 349-358, 2004.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Milk contamination in different points of the process: I) Aerobic mesophilics and psychrotrophics microorganisms. **Semina: Ciências Agrárias** 22, 145-154, 2001.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; ANASTÁCIO, P. I. B.; JÚNIOR, S. H. A.; SILVA, J. W.; NICOLAU, E.S. Avaliação do tempo de armazenamento sobre parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Totes** 64, 35-41, 2009.

SANTOS, A. S.; PIRES, C. V.; SANTOS, J. M.; COSTA SOBRINHO, P.S. Crescimento de micro-organismos psicrotróficos em leite cru refrigerado. **Brazilian Journal of Food and Nutrition** 24, 297-300, 2013.

SILVA, P. H. F. Leite UHT: **Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, UFL, Lavras, MG, 147pp., 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30, 2725–2729, 2013.

VIANA, E. S.; CAMPOS, M. E. M.; PONCE, A. R.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. **Biological Research** 42, 437-436, 2009.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI B.M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A.L. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 25, 698-704, 2005.

YOUNG, J.P.Y.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51, 89-103, 1991.

6 ARTIGO C

DESCRIÇÃO DE PATÓGENOS E OUTRAS BACTÉRIAS COMO DETERIORANTES DO LEITE CRU NO BRASIL

RESUMO

A utilização de novos métodos para identificação das bactérias presentes no leite, tem revelado que a diversidade da microbiota presente é maior do que a inicialmente descrita. O sequenciamento do DNA bacteriano permite identificar com precisão a microbiota presente no leite. No presente estudo, utilizando esta técnica, foram identificadas espécies de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas deteriorantes, que ainda não haviam sido descritas como microbiota no leite cru do Brasil. Foram identificadas cepas de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas proteolíticas e/ou lipolíticas, colhidas de ágar leite e ágar tributirina, previamente incubadas a 32°C por 48 horas. O DNA bacteriano foi extraído pela técnica de fervura e o gene 16rRNA foi amplificado parcialmente para posterior sequenciamento. Foi avaliada a qualidade das sequencias e realizado o agrupamento filogenético utilizando-se o software MEGA 6. As sequencias foram comparadas com dados do GenBank. Das 166 cepas mesófilas deteriorantes, foram identificadas oito espécies que ainda não haviam sido relatadas como microbiota deteriorante do leite no Brasil, equivalendo a 33 (19,87%) cepas isoladas correspondentes a estas espécies. Sendo 13 (7,83%) *Pseudomonas aeruginosa*; sete (4,21%) *Staphylococcus epidermidis*; cinco (3,01%) *Streptococcus dysgalactiae*; duas (1,20%) *Acinetobacter baumannii*; duas (1,20%) *Stenotrophomonas maltophilia*; duas (1,20%) *Empedobacter falsenii*; uma (0,60%) *Acinetobacter septicus* e uma (0,60%) *Macrococcus caseolyticus*. Das 27 cepas psicrotróficas proteolíticas e/ou lipolíticas isoladas, foram identificadas duas espécies que ainda não haviam sido isoladas como deteriorantes do leite cru no Brasil. Sendo uma com semelhança genética à espécie *Brevibacillus agri* (3,40%) e sete (25,92%) à espécie *Lactococcus garvieae*. Concluiu-se que a técnica utilizada no presente estudo revelou uma variedade de espécies bacterianas ainda não relatadas como microbiota deteriorante do leite no Brasil, sendo parte delas patógenos, com destaque para *Empedobacter falsenii*, isolada de alimento pela primeira vez.

Palavras-chave: Primeiro relato; PCR; filogenia; microbiologia.

DESCRIPTION OF PATHOGENS AND OTHER BACTERIA AS MILK spoilage RAW IN BRAZIL

ABSTRACT

The use of new methods for identification of bacteria in milk, has shown that the diversity of the microbiota is greater than the first described. The sequencing of bacterial DNA allows to accurately identify the microbiota present in milk. In this study, using this technique, species of mesophilic aerobic bacteria and spoilage psychrotrophic were identified that had not been described as microbiota in raw milk in Brazil. strains of bacteria have been identified mesophilic aerobic and proteolytic and / or lipolytic psychrotrophic, harvested milk agar agar tributyrin and preincubated at 32 ° C for 48 hours. The bacterial DNA was extracted by boiling technique and 16S rRNA gene was amplified partially for subsequent sequencing. the quality of the threads was evaluated and performed the phylogenetic grouping using the software MEGA 6. The sequences were compared with GenBank data. Of the 166 strains spoilage mesophilic, eight species were identified that had not been reported as deteriorating microbiota of milk in Brazil, equivalent to 33 (19.87%) strains corresponding to these species. And 13 (7.83%) *Pseudomonas aeruginosa*; seven (4.21%) *Staphylococcus epidermidis*; five (3.01%) *Streptococcus dysgalactiae*; two (1.20%) *Acinetobacter baumannii*; two (1.20%) *Stenotrophomonas maltophilia*; two (1.20%) *Empedobacter falsenii*; one (0.60%) and *Acinetobacter septicus* (0.60%) *Macrococcus caseolyticus*. 27 of proteolytic psychrotrophic strains and / or lipolytic isolated were identified two species that had not been isolated as spoilage of raw milk in Brazil. It is a genetic similarity with the species *Brevibacillus agri* (3.40%) and seven (25.92%) to the species *Lactococcus garvieae*. It was concluded that the technique used in this study revealed a variety of bacterial species not yet reported as deteriorating microbiota of milk in Brazil, part of them pathogens, especially *Empedobacter falsenii*, isolated for the first time food.

Key words: First report; PCR; phylogeny; microbiology.

Introdução

A população bacteriana do leite cru de vaca é constituída basicamente por bactérias ácido lácticas como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Na Europa e Estados Unidos, a utilização de novos métodos para identificação da microbiota do leite cru, como o sequenciamento do DNA de bactérias, tem destacado que a diversidade desta microbiota é maior do que o originalmente relatado (QUIGLEY et al., 2011; QUIGLEY et al., 2013).

A microbiota presente no leite cru também pode incluir micro-organismos psicrotróficos como bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* spp., que crescem durante o armazenamento em refrigeração (RAATS et al., 2011). No Brasil o estudo da microbiota deteriorante do leite tem revelado a bactéria *Pseudomonas* spp. com maior frequência, como nas pesquisas de Arcuri et al. (2008) e Pinto et al. (2015).

Alguns pesquisadores têm identificado a microbiota deteriorante do leite cru no Brasil. Mas técnicas moleculares ainda são pouco utilizadas para este fim. O sequenciamento do DNA bacteriano permite identificar com precisão estes micro-organismos, contribuindo para o conhecimento da diversidade microbiana presente no leite. No presente estudo, essa ferramenta molecular revelou bactérias mesófilas e psicrotróficas proteolíticas e/ou lipolíticas que ainda não haviam sido relatadas como microbiota deteriorante do leite cru no Brasil, sendo parte delas importantes patógenos casadores de infecções em animais e no homem.

Material e Métodos

As amostras foram assepticamente coletadas diretamente do tanque de armazenamento de leite de diferentes propriedades do estado do Maranhão-Brasil, entre setembro e outubro de 2014.

Para identificação genética foram colhidas colônias bacterianas aeróbias mesófilas e psicrotróficas que apresentavam halo de proteólise em ágar Leite (*Acumedia, Baltimore, USA*), suplementado (9:1) com solução de leite em pó desnatado reconstituído (10%) e halo de lipólise em ágar tributirina (*Himedia, Mumbai, India*) suplementado (99:1) com tributirina (*Himedia, Mumbai, India*),

previamente incubadas a 32°C/48h, segundo Beerens; Luquet (1990) e segundo Hantsis-Zacharov; Halpern (2007), respectivamente.

A identificação das bactérias deu-se pela técnica de sequenciamento do DNA. Foi extraído o DNA bacteriano das amostras utilizando-se a técnica de fervura. O gene 16S rRNA foi amplificado, utilizando-se os primers Y1 e Y3 conforme descrito por Chen et al. (2000) em termocilador (Aeris™ Thermal Cycler, Esco® Micro Pte, Singapore) segundo Young et al. (1991).

Os produtos da amplificação foram submetidos ao sequenciamento do ADN pelo método de Sanger com os primers 27f e 1492r (Osborne et al., 2005) em sequenciador automático (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

A análise de qualidade das sequências foi realizada através do eletroferograma gerado pelo software BioEdit (Ibis Bio-sciences, Carlsbad, CA, USA) e o agrupamento filogenético pelo software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram comparadas com o banco de dados do GenBank do National Center for Biotechnology Information utilizando-se da ferramenta "BLAST Search".

Resultados e discussão

Foram identificadas 166 cepas bacterianas mesófilas proteolíticas e/ou lipolíticas. Oito espécies identificadas ainda não haviam sido relatadas como microbiota deteriorante do leite no Brasil, sendo que 33 (19,87%) cepas apresentaram semelhança genética a estas espécies depositadas no GenBank.

Tabela 7 – Bactérias mesófilas isoladas pela primeira vez como deteriorantes do leite cru no Brasil, adquirido de propriedades leiteiras de três regiões do estado do Maranhão, entre setembro e outubro de 2014

Bactérias mesófilas	n (%)	(%) atividade deteriorante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 (7,83)	(100) lipolíticas
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7 (4,21)	(100) proteolíticas
<i>Streptococcus dysgalactieae</i>	5 (3,01)	(80) lipol. / (20) prot/lipo
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 (1,20)	(50) prot. / (50) lipo.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 (1,20)	(50) prot. / (50) lipo.
<i>Empedobacter falsenii</i>	2 (1,20)	(100) lipolíticas
<i>Acinetobacter septicus</i>	1 (0,60)	(100) proteolítica
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	1 (0,60)	(100) lipolítica

Do total de cepas mesófilas deteriorantes isoladas 13 (7,83%) foram verificadas com semelhança genética à espécie *Pseudomonas aeruginosa*, todas com atividade lipolítica; sete (4,21%) cepas apresentaram semelhança genética à espécie *Staphylococcus epidermidis* sendo todas as cepas com atividade proteolítica; cinco (3,01%) apresentaram semelhança genética à espécie *Streptococcus dysgalactiae* sendo 80% adquiridas de cepas lipolíticas e 20% de cepas proteolíticas e lipolíticas simultaneamente; duas (1,20%) cepas, foram semelhantes geneticamente à espécie *Acinetobacter baumannii* e duas (1,20%) à *Stenotrophomonas maltophilia*, sendo nos dois casos, uma cepa (50%) proteolítica e uma (50%) lipolítica. E outras duas (1,20%) cepas foram semelhantes à espécie *Empedobacter falsenii*, ambas lipolíticas. Além destas, uma (0,60%) cepa proteolítica foi semelhante à espécie *Acinetobacter septicus*, e uma (0,60%) cepa lipolítica à espécie *Macrococcus caseolyticus* (Tab. 7).

P. aeruginosa é um importante patógeno, associado a Infecções do trato urinário, infecções no sistema respiratório, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções oftalmológicas, infecções ósseas e articulares e outras infecções sistêmicas (KERR; SNELLING, 2009; LISTER et al., 2009; BALASUBRAMINA et al., 2012; ROBERTSON et al., 2011). *Pseudomonas* é um conhecido deteriorante em leite em todo o mundo (Wiedmann et al., 2000; Nicodeme et al., 2005; Boran; Ugur, 2010; De Jonghe et al., 2011), tendo sido relatado também no Brasil. No entanto, a espécie *P. aeruginosa*, embora já descrita no leite brasileiro (Fagundes,2004), ainda não havia sido correlacionada à deterioração da porção lipídica do leite. A presença de *Pseudomonas* em leite cru está relacionada à falta de higiene na obtenção do leite.

Da mesma forma, a espécie *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria Gram positiva, faz parte das espécies de estafilococos coagulase negativas e conforme sua denominação habita a pele. É um importante patógeno associado à infecções cardíacas, hospitalares e à mastite bovina. São bastante adaptadas às glândulas mamárias das vacas e parecem usá-la como reservatório de fonte de infecção (PIESSENS et al., 2012, TOMAZI et al., 2014). Além disso, há relatos da produção de enterotoxina por esta espécie em leite cru, no Brasil (CARMO, 2002). No entanto, *S. epidermidis* ainda não havia sido descrito como deteriorante do leite no país. Nossos estudos demonstraram que este micro-organismo apresenta uma importante capacidade proteolítica do leite e, considerando sua frequência como

agente etiológico de mastites bovinas clínicas e subclínicas, acrescenta-se mais uma motivação para seu efetivo controle na produção leiteira.

As espécies *Acinetobacter baumannii* e *Acinetobacter septicus* emergiram como importantes agentes patogênicos, causando infecções em pacientes de unidades de terapia intensiva (PELEG et al., 2008; KILIC et al., 2008). Este gênero já foi isolado realizando proteólise e lipólise em leite cru no Brasil por Arcuri et al. (2008), Pinto et al. (2015) e Perin et al. (2012). Entretanto, as espécies *A. baumannii* e *A. septicus* ainda não haviam sido encontradas como parte da microbiota.

A bactéria *Streptococcus dysgalactiae* é Gram-positiva e normalmente isolada do leite de vacas com mastite (SCHUKKEN et al., 2013). Sua presença como microbiota proteolítica e/ou lipolítica do leite é pouco relatada. No Brasil a espécie ainda não tinha sido identificada como parte desta microbiota.

A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* é uma bactéria Gram-negativa que tem capacidade de formar biofilmes no ambiente industrial e reduzir a vida útil de prateleira do leite por atividades enzimáticas (CLETO et al., 2012). A espécie *S. maltophilia* identificada está sendo relatada pela primeira vez no Brasil, com atividade proteolítica e lipolítica no leite, e corrobora os achados de Perin et al. (2012) que já haviam relatado este gênero no país, bem como sua atividade lipolítica no leite.

A identificação da espécie *Empedobacter falsenii* tem especial importância por ter sido isolada recentemente, em 2012, a partir de uma amostra de urina de uma criança com infecção, ainda com a denominação de *Wautersiella falsenii* por Van der Velder et al. (2012). Traglia et al. (2015) relatam que a espécie *Empedobacter falsenii* não hidrolisa ou hidrolisa fracamente a caseína. Sua presença no leite e em outros alimentos até a realização do presente estudo, era desconhecida, assim como sua capacidade de deteriorar lipídios do leite.

O gênero *Macrococcus* é intimamente relacionado com o gênero *Staphylococcus* (TSUBAKISHITA et al., 2010). É geralmente isolado a partir da pele e alimentos de origem animal tais como leite e carne. *Macrococcus caseolyticus* tem grande importância por ser resistente a meticilina (BABA et al., 2009). Esta espécie ainda não tinha sido isolada no Brasil como deteriorante do leite. E, apesar de sua denominação remeter à atividade proteolítica, esta não foi identificada, sendo detectada apenas a atividade lipolítica.

Quanto às bactérias psicrotróficas proteolíticas e/ou lipolíticas foram obtidas 27 cepas para identificação molecular. Destas, oito cepas, pertencentes à duas espécies diferentes ainda não haviam sido relatadas como integrantes da microbiota deteriorante do leite no Brasil.

Uma (3,70%) das cepas foi identificada como *Brevibacillus agri*, e apresentou atividade proteolítica e lipolítica simultaneamente. Segundo Nazina et al. (2001), esta espécie caracteriza-se por ser gram-positiva, aeróbia e formadora de esporo. Além de ser catalase positiva e apresentar temperatura ótima de crescimento a 28°C (NAKAMURA, 1993). O habitat das espécies deste gênero é semelhante ao do gênero *Bacillus* que sobrevivem em diversos ambientes como poeira, rochas, ambientes aquáticos e intestinos de insetos e outros animais (NICHOLSON, 2002). Ribeiro Júnior (2015) identificando a microbiota esporulada, deteriorante isolada de leite cru refrigerado no estado do Paraná, isolou bactérias do gênero *Brevibacillus*. Entretanto, até a realização do presente estudo não havia relatos de isolamento da espécie *B. agri*, como deteriorante do leite cru em pesquisas nacionais.

Outras sete (25,92%) cepas foram identificadas geneticamente como *Lactococcus garvieae*, que é um patógeno oportunista para o homem, sendo a endocardite a infecção mais comum provocada por ele (WILBRING et al., 2011), além de ser um importante patógeno de peixes (VENDRELL et al., 2006). Foi inicialmente isolada a partir de mastite de uma vaca no Reino Unido (COLLINS et al., 1983; KLINJ et al., 1995). Já foi encontrada também em amostras de fezes de pessoas saudáveis considerando-se a espécie como comensal do trato gastrointestinal humano (KLINJ et al., 1995). Também já foi isolada de rios e de águas de esgoto (Aguado-Urda et al., 2010) e associado com alimentos crus como leite, carne, legumes, peixes e seus produtos (FORTINA et al., 2009; KLIJN et al., 1995; RAATS et al., 2011). Porém, não havia relatos de seu isolamento como bactéria deteriorante do leite em pesquisas sobre essa microbiota no Brasil.

A origem da contaminação do leite por estes micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, pode estar relacionada às práticas higiênicas precárias no ambiente de ordenha, ou à veiculação pelo ordenhador através de mãos contaminadas, uma vez que foram identificadas bactérias ambientais e também patogênicas, como *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *A. septicus*, *L. garvieae* e *B. agri*.

Além de bactérias encontradas na pele ou eliminadas nas fezes do homem como *S. epidermidis* e *L. garvieae*.

Apesar das bactérias identificadas no presente estudo não serem patogênicas para o homem a partir da ingestão de alimentos contaminados, sua presença em abundância na cadeia alimentar pode ter um efeito grave sobre as futuras opções de tratamento para uma ampla gama de infecções causada por bactérias, como observado por Overdeest et al. (2011) em seu estudo.

Conclusão

A técnica de identificação molecular de bactérias proteolíticas e/ou lipolíticas do leite cru permitiu verificar uma variedade de espécies de bactérias que ainda não haviam sido relatadas como microbiota deteriorante do leite no Brasil. Destacando-se a espécie *E. falsenii* para a qual não foram encontrados registros quanto sua atividade deteriorante no leite em pesquisas nacionais e internacionais. Além de não existirem relatos, até realização do presente estudo, sobre sua presença e atividade em alimentos.

Referências

- AGUADO-URDA, M., CUTULI, M. T., BLANCO, M. M., ASPIROZ, C., TEJEDOR, J. L., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F. Utilization of lactose and presence of the phospho-beta-galactosidase (lacG) gene in *Lactococcus garvieae* isolates from different sources. **International Microbiology**, 13, 189-193, 2010.
- 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 psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural** 38, 2250-2255, 2008.
- BABA, T., KUWAHARA-RAI, K., UCHIYAMA, I., TAKUCHI, F., ITO, T., HIRAMATSU, K. Complete genome sequence of *Micrococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic Staphylococci. **Journal of Bacteriology** 191, 1180-1190, 2009.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCNEPER, L.; KUMAN, H.; MATHEE, k. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research** 41, 1-20, 2013.
- BEERENS, H., LUQUET, F.M. **Guía práctico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acríbia S.A. 141p. 1990.
- BORAN, R.; UGUR, A. Partial purification and characterization of the organic solvent-tolerant lipase produced by *Pseudomonas fluorescens* RB02-3 isolated from milk. **Preparative Biochemistry & Biotechnology** 40, 229-241, 2010.
- CARMO, L. S. Revista Minas Faz Ciência, n.11, jun/ag, 2002. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br.htm>>. Acesso em: 15 de março de 2015.
- CHEN, L. S., FIGUEREDO, A., PEDROSA, F. O., HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 5099-5103, 2000.

CLETO, S., MATOS, S., KLUSKENS, L., VIEIRA, M., KAUFMANN, G.

Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant (Contaminants from a Sanitized Milk Plant). **PLOS ONE** 7, 1-8, 2012.

COLLINS, M. D, FARROW, J.A, PHILLIPS, B.A, KANDLER, O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. **Journal of General Microbiology** 129, 3427-3431, 1983.

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** 77, 460-470, 2011.

FAGUNDES, C. M. Milk point. 2004. Disponível

em:<<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/presenca-de-microrganismos-psicrotroficos-em-especial-pseudomas-spp-no-leite-recemobtido-e-refrigerado-em-funcao-de-distintos-20282n.aspx>>. Acesso: 14 de 03 de 2016.

FORTINA, M. G., RICCI, G., BORGIO, F. A study of lactose metabolism in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing between dairy and fish biotypes. **Journal of Food Protection**, 72, 1248-1254, 2009.

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

KEER, K. G.; SNELLING, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection** 73, 338-344, 2009.

KILIC, A., HAIJING, L., MELLMANN, A., BASUSTAOGU, A. C., KUL, M., ZEYNEP, S., AYDOGAN, H., STRATTON, C. W., HARMSSEN, D., TANG, Y. *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology** 46, 902-908, 2008.

KLIJN N, WEERKAMP A. H, De VOS, W.M. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. **Applied Environmental Microbiology** 61,788–92,1995.

LISTER, P. D.; WOLDER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews** 22, 582-610, 2009.

NAKAMURA, L. K. DNA relatedness of *Bacillus brevis* Migula 1900 strains and proposal of *Bacillus agri* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus centrosporus* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology** 43, 20–25,1993.

NAZINA, T. N., TOUROVA, T. P., POLTARAUS, A. B., NOVIKOVA, E. V., GRIGORYAN, A. A., IVANOVA, A. E., LYSENKO, A. M., PETRUNYAKA, V.V., OSIPOV, G. A., BELYAEV, S. S., IVANOV, M. V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermoleovorans*, *B. kaustophilus*, *B. thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51, 433–446, 2001.

OSBORNE, C. A., GALIC, M., SANGWAN, P., JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 248, 183–187, 2005.

NICODEME, M.; Gril, J. P.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology** 99, 641-648, 2005.

NICHOLSON, W. L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. **Cellular and Molecular Life Sciences** 59410–416, 2002.

OSBORNE, C. A., GALIC, M., SANGWAN, P., JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters** 248, 183–187, 2005.

OVERDEVEST, I.; WILLEMSSEN, I.; RIJNSBURGER, M.; EUSTACE, A.; LI XU, HAWKEY, P.; HECK, MAX.; SAVELKOUL, PAUL.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; ZWALUW, K. V. D.; HUIJSDENS, X.; KLUYTMANS, J. Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases** 17, 1216-122, 2011.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews** 21, 538-582, 2008.

PERIN, L.M., MORAES, P. M., ALMEIDA, M. V., NERO, L. A. Interferência de Temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicotróficas, lipolítica e proteolítica de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias** 33, 333-342, 2012.

PIESSENS, V., S. De VLIEGHER, B. VERBIST, G. BRAEM, A. VAN NUFFEL, L. De VUYST, M. HEYNDRICKX, E. VAN COILLIE. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative staphylococcus species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology** 155, 62–71, 2012.

PINTO, C.L.O., MACHADO, S. G., MARTINS, M. L., VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 70, 105-116, 2015.

QUIGLEY, L., O'SULLIVAN; STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COTTER, P. D. Molecular approaches to analysing the microbiol. Composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology** 150, 81-94, 2011.

QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, C., STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews** 37, 664-698, 2013.

RAATS, D., OFFEK, M., MINIZ, D., HALPEN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology** 28, 465-471, 2011.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. **Microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, UEL, Londrina-PR, 71f., 2015.

ROBERTSON, D. M.; PARKS, Q. M., YONG, R. L.; KRET, J.; POCH, K. R.; MALCOLM, K. C.; NICHOLS, D. P.; NICHOLS, M.; ZBU, M.; CAVANAGH, H. D.; NICK, J. A. Disruption of contact lens-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formed in the presence of neutrophils. **Invest Ophthalmol Visual Science** 52, 2844-2850, 2011.

SCHUKKEN, Y. H., ZURAKOWSKI, M. J., RAUCH, B. J., GROSS, B., TIKOFFSKY, L. L., WELCOME, F. L. Noninferiority trial comparing a first-generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 96, 6763-6774, 2013.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30, 2725–2729, 2013.

TOMAZI, T., GONÇALVES, J. L., BARREIRO, J. R., BRAGA, P. A. C., SILVA, L. F. P., EBERLIN, M. N., SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative Staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology** 52, 1658-1663, 2014.

TRAGLIA, G., DIXON, C., CHIEM, K., ALMUZARA, M., Barberis, C., MONTAÑA, S., RAMÍREZ, M. Draft Genome Sequence of *Empedobacter* (Formerly *Wautersiella*) *falsenii* comb. nov. Wf282, a Strain Isolated from a Cervical Neck Abscess. **Genome Announcements** 3, 1-2, 2015.

TSUBAKISHITA, S., KUWAHARA-ARAI, K., BABA, T., HIRAMATSU, K. Staphylococcal cassette chromosome *mec*-Like element in *Macrococcus caseolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 54, 1469-1475, 2010.

VAN DER VELDEN, L. B. J., DE JONG, A. S., DE JONG, H., DE GIER, R. P. E., RENTENAAR, R. J. First report of a *Wautersiella falsenii* isolated from the urine of an infant with pyelonephritis. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease** 74, 404-405, 2012.

VENDRELL, D., BALCÁZAR, J. L., RUIZ-ZARZUELA, I., BLAS, I., GIRONÉS, O., MÚZQUIZ, J. L. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. **Comparative Immunology Microbiology & Infections Diseases** 29, 177-198, 2006.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, K. J. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 2085-2095, 2000.

WILBRING, M., ALEXIOU, K., REICHENSPURNER, H., MATSCHKE, K. TUGTEKIN, S. M. *Lactococcus garvieae* causing zoonotic prosthetic valve endocarditis. **Clinical Research in Cardiology** 100, 545-546, 2001.

YOUNG, J.P.Y., KUYKENDALL, L.D., MARTÍNEZ-ROMERO, E., KERR, A., SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51, 89-103, 1991.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A microbiota do leite maranhense nas situações amostradas é predominantemente mesófila sendo a capacidade adaptativa psicotrófica ainda pouco frequente.
- ✓ A atividade deteriorante proteolítica e lipolítica é também menor que a relatada em outros estudos sobretudo o de estados em regiões de clima temperado.
- ✓ A capacidade lipolítica foi predominante entre as bactérias mesófilas e psicotróficas deteriorantes isoladas.
- ✓ A microbiota do leite maranhense mostrou uma variada composição, incluindo micro-organismos ainda não descritos como deteriorantes no Brasil e uma espécie ainda não havia sido isolada de alimentos no Brasil e em outros países.
- ✓ Vários micro-organismos mesófilos identificados são conhecidos psicotróficos como a *Pseudomonas* e *Klebsiella*. É provável que a capacidade adaptativa se revele quando as condições obrigatórias de refrigeração do leite forem implantadas nas regiões onde foi realizado o estudo.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Temperaturas ambiente nos dias de coleta das amostras de leite cru

Datas das Coletas	Amostras	T°Cmin	T°Cmed	T°Cmáx
10/09/2014	A,B	24	30,6	36,9
26/09/2014	C	24,8	30,8	38,4
07/10/2014	D,E	25,2	30,5	38,6
08/10/2014	F	24,6	31,4	40
10/10/2014	G,H,I,J	23,9	31,9	39,8

APÊNDICE B

Temperaturas das amostras de leite cru refrigerado no momento da coleta

Datas das Coletas	Amostras	T°C
10/09/2014	B	10
07/10/2014	E	11
10/10/2014	H	12
10/10/2014	I	11
10/10/2014	J	12

APÊNDICE C

Resultado do agrupamento de bactérias aeróbias mesófilas, cepa selecionada para sequenciamento, identificação genética e percentual de identidade

GRUPOS	CÓDIGO CEPAS	CEPA SEQUENCIADA	BACTÉRIA IDENTIFICADA	% IDENTIDADE
1	FAML23			
	GAML16			
	GAML18			
	GAML24			
	GAML25			
	GAML26			
	GAML3	GAML43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
	GAML34A			
	GAML37			
	GAML41			
	GAML41A			
	GAML43			
	HAML2			
2	CAML12			
	CAML13			
	CAML2			
	CAML4			
	CAML5			
	CAML6			
	CAML7			
	CAML8			
	CAML9			
	CAMP3			
	CAMPL1			
	CAMPL2	EAML33	<i>Klebsiella sp.</i>	100
	EAML15			
	EAML17			
	EAML25			
	EAML27			
	EAML28			
	EAML29			
EAML30				
EAML31				
EAML32				
EAML33				
EAML34				

EAML35
EAML36
EAML38
EAML39
EAML40
EAML41
EAML5
EAMP13
EAMP19
FAML6
GAML1
GAML10
GAML11
GAML12
GAML13
GAML14
GAML15
GAML19
GAML20
GAML23
GAML25
GAML27
GAML28
GAML3
GAML30
GAML33
GAML34B
GAML35
GAML36
GAML38
GAML4
GAML40
GAML40B
GAML41B
GAML42
GAML5
GAML6
H1
H3
H4
H6
H7
HAML1
HAML10

HAML11
 HAML12
 HAML13
 HAML15
 HAML16
 HAML17
 HAML18
 HAML19
 HAML20
 HAML22
 HAML24
 HAML25
 HAML26
 HAML27
 HAML28
 HAML29
 HAML3
 HAML30
 HAML31
 HAML32
 HAML4
 HAML5
 HAML6
 HAML7
 HAML8
 HAML9
 J4
 J9

BAML10
 BAML2
 BAML3
 BAMP1
 BAMP2
 BAMP6
 BAMP7
 BAMPL1
 BAMPL10
 BAMPL2
 BAMPL3
 BAMPL5
 FAML10
 FAML11
 FAML2
 H5

3

FAML2

Acinetobacter sp.

100

	HAML14 HAML23			
4	EAML19 EAML21 EAML24	EAML24	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	100
5	BAMPL3 BAMPL7 BAMPL8	BAMPL7	<i>Pseudomonas sp.</i>	100
6	DAMPL2 EAML20	EAML20	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	100
7	EAML8	EAML8	<i>Brevibacillus sp.</i>	100
8	HAML3	HAML3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
9	AAMP23	AAMP23	<i>Bacillus sp.</i>	100
10	AAMP26	AAMP26	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
11	AAMP27	AAMP27	<i>Staphylococcus sp.</i>	100
12	EAML1 EAML36 EAML37	EAML37	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	100
13	EAMP8 GAML38	EAMP8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100
14	BAMP8 GAML1	GAML1	<i>Chryseobacterium sp</i>	100
15	BAML4	BAML4	<i>Empedobacter falsenii</i>	100
16	BAML6	BAML6	<i>Empedobacter falsenii</i>	100
17	AAMP12 AAMP17 AAMP18 AAMP29 AAMP31 AAMP35 AAMP4 AAMP7	AAMP17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100
18	AAMP30	AAMP30	<i>Acinetobacter sp.</i>	100
19	AAMP32 AAMP35	AAMP35	<i>Microbacterium sp.</i>	100
20	AAMP36	AAMP36	<i>Bacillus sp.</i>	100
21	AAMP9	AAMP9	<i>Acinetobacter septicus</i>	100
22	AAMP19 AAMP20	AAMP19	<i>Bacillus sp.</i>	100
23	FAML7	FAML7	<i>Pseudomonas sp.</i>	100
24	FAML12	FAML12	<i>Pseudomonas sp.</i>	100
25	GAML17	GAML17	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	100
26	FAML15	FAML15	<i>Pseudomonas sp.</i>	100

APÊNDICE D

Resultado do agrupamento de bactérias psicrotróficas, cepa selecionada para sequenciamento, identificação genética e percentual de identidade

GRUPOS	CÓDIGO CEPAS	CEPA SEQUENCIADA	BACTÉRIA IDENTIFICADA	% IDENTIDADE
1	EPSSL2	EPSSL25	<i>Enterococcus</i> sp.	100
	EPSSL10			
	EPSSL19			
	EPSSL23			
	EPSSL25			
	EPSSL26			
	EPSSL29			
EPSLP5				
2	EPSLP4	EPSLP4	<i>Bacillus</i> sp.	100
3	EPSSL27	EPSSL27	<i>Pantoea</i> sp.	100
4	EPSSL32	EPSSL32	<i>Pantoea</i> sp.	100
5	EPSLP1	EPSLP1	<i>Klebsiella</i> sp.	100
6	EPSLP14	EPSLP14	<i>Enterococcus</i> sp.	100
7	EPSLP8	EPSLP12	<i>Hafnia alvei</i>	100
	EPSLP12			
8	EPSLP10	EPSLP10	<i>Enterococcus</i> sp.	100
9	EPSLP13	EPSLP13	<i>Brevibacillus agri</i>	100
10	FPSLP7	FPSLP7	<i>Bacillus</i> sp.	100
11	EPSSL17	EPSSL17	<i>Enterococcus</i> sp.	100
12	EPSSL1	EPSSL1	<i>Lactococcus garvieae</i>	99
13	EPSSL35	EPSSL35	<i>Enterococcus</i> sp.	100
14	EPSLP15	EPSLP15	<i>Lactococcus garvieae</i>	100
15	EPSSL3	EPSSL22	<i>Lactococcus garvieae</i>	100
	EPSSL7			
	EPSSL8			
	EPSSL13			
	EPSSL22			