



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA
ESPORULADA E FÚNGICA ASSOCIADA À
DETERIORAÇÃO DO LEITE**

Londrina
2015

JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA
ESPORULADA E FÚNGICA ASSOCIADA À
DETERIORAÇÃO DO LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R484i Ribeiro Júnior, José Carlos.
Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à
deterioração do leite / José Carlos Ribeiro Júnior. – Londrina, 2015.
77 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Leite – Microorganismos – Teses. 2. Leite – Deterioração – Teses. 3.
Esporos bacterianos – Teses. 4. Enzimas de fungos – Teses. I. Beloti, Vanerli. II.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 637.1:579

JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA ESPORULADA
E FÚNGICA ASSOCIADA À DETERIORAÇÃO DO LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profª Dra. Julia Arantes Galvão
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Profª Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo incentivo à minha formação acadêmica.

A minha orientadora, Prof^a Dra. Vanerli Beloti, pelos 7 anos de dedicação à minha formação, desde a iniciação científica.

Agradeço também à equipe do Prof^o Dr. André Luiz de Oliveira, Karina e Mônica, e à Prof^a Dra. Maria Helena Fungaro e a sua orientada, Fernanda Massi, por toda a colaboração para a realização desse trabalho. Além da doutoranda Brígida Alcantara (Bucha), que tanto colaborou para as análises de sequenciamento no Laboratório de Virologia da UEL.

Aos grandes amigos feitos no LIPOA desde 2008, João Paulo Araújo, Rafael Máximo, Carolina Shecaira, Livia Cavaletti, Francine Fernandes, Débora Garcia, Márcia Rocha, Francielle de Abreu e Fernanda Blasques.

Agradeço também a atual equipe do LIPOA, residentes, estagiários e pós-graduandos que tanto colaboraram para a realização desse trabalho: Juliana Mareze, Natália Gonzaga, Gabriela, Juliana Ramos, Eric Ossugui e Lorena Natalino.

Aos amigos que sempre me acompanharam e incentivaram João Fernando, Rafael Zanon, Luana Freitas, Jacqueline Nepomuceno e Natália Ayres.

Agradeço também a banca de qualificação e defesa que gentilmente aceitou o convite para participação da avaliação e colaboração nesse trabalho.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos. **Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração: Sanidade Animal) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

RESUMO

A produção de leite vem aumentando no estado do Paraná e no Brasil, porém, a sua qualidade ainda é um problema. A baixa qualidade do leite cru refrigerado brasileiro faz com que a vida útil do leite pasteurizado não alcance seis dias. O aumento da vida útil do leite pasteurizado está diretamente relacionado à redução das contagens de micro-organismos deteriorantes proteolíticos e lipolíticos, sobretudo os termodúricos e esporulados no leite cru, que constituirão a microbiota remanescente no leite pasteurizado. Não há dados no Brasil sobre a composição da microbiota esporulada e fúngica termodúrica presente no leite, dificultando o seu controle. O presente trabalho teve por objetivo identificar os micro-organismos formadores de esporos e a microbiota fúngica do leite cru refrigerado com atividade proteolítica e/ou lipolítica por técnicas moleculares. Foram avaliadas 20 amostras de leite cru refrigerado produzido na bacia leiteira de Castro, região central do estado do Paraná, nas quais foram realizadas a contagem de esporos aeróbios, verificação da atividade proteolítica e lipolítica dos isolados, amplificação parcial do gene 16S rRNA, sequenciamento e identificação por similaridade usando a ferramenta BLAST para comparação com as sequências depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para o isolamento dos fungos, as amostras de leite cru foram submetidas à pasteurização laboratorial, semeadas e incubadas em temperaturas apropriadas para a multiplicação de bolores e leveduras termodúricos mesófilos e psicotróficos. Também foi avaliado o potencial proteolítico dos isolados obtidos, que foram identificados por microscopia óptica e confirmados por sequenciamento da região ITS do DNA. As contagens de esporos aeróbios variaram de 1 a 3,7 log UFC.mL⁻¹, com média de 1,75 ($\pm 0,59$) log UFC.mL⁻¹. Foram obtidos 137 isolados puros de bactérias a partir da germinação dos esporos, dos quais 40 (29,2%) apresentaram atividade deteriorante do leite. Dessas, 31 (77,5%) foram proteolíticas e lipolíticas, 7 (17,5%) foram exclusivamente lipolíticas e 2 (5%) foram apenas proteolíticas. As 40 cepas de esporos aeróbios proteolíticos e/ou lipolíticos submetidas ao sequenciamento do 16S rRNA, foram identificadas como: *Bacillus licheniformis* (55%), *Bacillus sp.* (27,5%), *Paenibacillus sp.* (7,5%), *Bacillus pumilus* (5%), *Bacillus circulans* (2,5%) e *Brevibacillus sp.* (2,5%). Estudos anteriores sobre a composição da microbiota do leite cru refrigerado brasileiro não relatam a presença de micro-organismos do gênero *Paenibacillus*, apesar de ser um grupo de micro-organismos frequentemente descrito nos trabalhos desenvolvidos em outros países. Dos 22 isolados de *B. licheniformis*, 21 (95,5%) apresentaram atividade proteolítica e lipolítica e 1 (4,5%) foi apenas proteolítico. As duas cepas de *B. pumilus* foram proteolíticas e lipolíticas, enquanto a cepa de *B. circulans* foi apenas lipolítica. Em relação aos 11 isolados de *Bacillus sp.*, oito (72,7%) foram proteolíticos e lipolíticos, um (9,1%) foi proteolítico e outros dois (18,2%) lipolíticos. Os três isolados de *Paenibacillus sp.* foram apenas lipolíticos, assim como a cepa de *Brevibacillus sp.* Com relação aos fungos, foram obtidos 11 isolados, um mesófilo e outros 10 psicotróficos. Todos os isolados foram proteolíticos. O sequenciamento do DNA fúngico amplificado confirmou a identificação microscópica, sendo a cepa termodúrica mesófila identificada como espécie do complexo *Fusarium chlamydosporum* (9,09%), e os psicotróficos como *Cladosporium cladosporoides* (54,54%), *Curvularia geniculatus* (9,09%) e os outros 3

isolados foram identificados como *Geotrichum candidum* (27,27%). A presença de fungos termodúricos mesófilos e psicrotróficos proteolíticos no leite cru pode resultar em redução da vida útil do leite pasteurizado, bem como em risco à saúde pela presença de cepas patogênicas e produtoras de micotoxinas. A redução dos micro-organismos termodúricos, proteolíticos e/ou lipolíticos no leite cru, diminui a quantidade de micro-organismos e enzimas deteriorantes termoestáveis no leite pasteurizado, aumentando sua vida útil.

Palavras-chave: Esporos. Fungos. Lipólise. Proteólise. Vida útil.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos. **Isolation and identification of bacterial spore-forming and fungal microbiota associated with milk spoilage.** 2015. 77 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Milk production has increased in the Paraná state and Brazil, but its quality is still a important problem. The low quality of brazilian refrigerated raw milk makes the shef-life of pasteurized milk not reach 6 days. Increased shelf-life of pasteurized milk is directly related to the reduction of microorganisms counts proteolytic and lipolytic rough, especially thermoduric and spores in raw milk, which constitute the remaining microbiota in pasteurized milk. There is no data in Brazil about the composition of the spore-forming and thermoduric fungal microbiota in milk, hindering the control. The aim this study was to identify the microorganisms spore-forming and mycoflora of refrigerated raw milk with proteolytic and/or lipolytic activity by molecular biological techniques. Were evaluated 20 samples of refrigerated raw milk produced in the dairy region Castro, Paraná, Brazil, in which were performed aerobic spore count, verification of proteolytic and lipolytic activity of the isolated, partial amplification of the 16S rRNA gene, identification by sequencing data and comparison with the sequences deposited in GenBank of National Center for Biotechnology Information (NCBI). For the isolation of thermoduric fungi, the raw milk samples were subjected to laboratory pasteurization, plated and incubated at appropriate temperatures for multiplication of molds and yeasts mesophilic and psychrotrophic. We also assessed the proteolytic potential of these isolates that were identified by optical microscopy and confirmed by sequencing data the ITS region of DNA. Aerobic spore counts ranged from 1 to 3.7 log CFU.mL⁻¹, with a mean of 1.75 (\pm 0.59) log CFU.mL⁻¹. One hundred thirty-seven bacterial isolates were obtained from germination of spores, of which 40 (29.2%) showed deteriorating activity of milk. Of these, 31 (77.5%) were proteolytic and lipolytic, 7 (17.5%) were exclusively lipolytic and 2 (5%) were only proteolytic. The 40 strains of aerobic spore-forming proteolytic and/or lipolytic sequencing to 16S rRNA were identified as *Bacillus licheniformis* (55%), *Bacillus sp.* (27.5%), *Paenibacillus sp.* (7.5%), *Bacillus pumilus* (5%), *Bacillus circulans* (2.5%) and *Brevibacillus sp.* (2.5%). Previous studies about the microbiota of brazilian refrigerated raw milk not report the presence of *Paenibacillus* genus, although a group of microrganisms frequently described the work undertaken in other countries. Of the 22 isolates of *B. licheniformis*, 21 (95.5%) showed proteolytic and lipolytic and 1 (4.5%) was only proteolytic. The 2 strains of *B. pumilus* are proteolytic and lipolytic while the strain of *B. circulans* was only lipolytic. Of the 11 isolates of *Bacillus sp.*, 8 (72.7%) were proteolytic and lipolytic, 1 (9.1%) was proteolitic and other 2 (18.2%) were lipolytic only. The 3 isolates of *Paenibacillus sp.* were just lipolytic as well as the strain of *Brevibacillus sp.*. For fungi were obtained 11 strains, 1 mesophilic and 10 psychrotrophic. All isolates were proteolytic. The sequencing data of the amplified DNA confirmed fungal microscopic identification, and the strain identified as thermoduric mesophilic species complex *Fusarium chlamydosporum* (9.09%) and the psychrotrophic as *Cladosporium cladosporoides* (54.54%), *Curvularia geniculatus* (9.09%) and the other 3 isolates were identified as *Geotrichum candidum* (27.27%). The presence of mesophilic and psychrotrophic thermoduric proteolytic fungi in raw milk may result in shortening the shelf-life of pasteurized milk, as well as health risk by the presence of patogenic strains and mycotoxin production. The reduction of microorganisms

thermoduric, proteolytic and/or lipolytic on raw milk decreases the amount of spoilage microorganisms and thermostable enzymes in pasteurized milk, increasing its shelf-life.

Key Words: Fungi. Lipolysis. Proteolysis. Spores. Shelf-life.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Estado da Arte

- Figura 1** – Produção de leite no Brasil entre 2008 a 2013 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013) 18
- Figura 2** – Volume de leite processado pelos laticínios da região sul do Brasil e do estado do Paraná entre 2008 a 2013 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013) 19

Artigo A

- Figura 3** – Distribuição da contagem (log) de esporos aeróbios em 20 amostras de leite cru refrigerado coletadas na região de Castro, Paraná, no período de novembro de 2013 a maio de 2014 48
- Figura 4** – Halos de proteólise em ágar leite de cepas de bactérias formadoras de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado coletado na região de Castro, Paraná, entre novembro de 2013 a maio de 2014. 49
- Figura 5** – Halos de lipólise em ágar tributirina de cepas de bactérias formadoras de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado coletado na região de Castro, Paraná, entre novembro de 2013 a maio de 2014. 49
- Figura 6** – Morfologia de bactérias aeróbias formadoras de esporos isoladas de leite cru refrigerado na coloração de Gram 50
- Figura 7** – Resultado da reação de PCR de 5 cepas de bactérias formadoras de esporos isoladas de amostras de leite cru refrigerado da região de Castro, Paraná, coletadas no período de novembro de 2013 a maio de 2014. 50
- Figura 8** – Árvore filogenética construída utilizando o método *Neighbor-joining* baseado no alinhamento de 602 pb do 16S rRNA de bactérias formadoras de esporos 53

Artigo B

- Figura 9** – Halo de proteólise em ágar leite suplementado semeado em três pontos com *Cladosporium cladosporoides*..... 66
- Figura 10** – Característica macroscópica de *Cladosporium* isolado de leite cru refrigerado em meio *Czapek Yeast Autolysate Agar* 67
- Figura 11** – Característica macroscópica de *Curvaria* isolado de leite cru refrigerado em meio *Czapek Yeast Autolysate Agar*..... 67
- Figura 12** – Característica macroscópica de *Geotrichum* isolado de leite cru refrigerado em meio *Czapek Yeast Autolysate Agar*..... 67
- Figura 13** – Característica macroscópica de *Fusarium* isolado de leite cru refrigerado em meio *Czapek Yeast Autolysate Agar*..... 67
- Figura 14** – Eletroforese das amostras de rRNA de fungos termofílicos mesófilos e psicrófilos isolados de leite após amplificação com os primers ITS1 e ITS4..... 68

LISTA DE QUADROS

Estado da Arte

- Quadro 1** – Progressão dos padrões de Contagem Padrão em Placas (CPP) de micro-organismos do leite cru refrigerado em diferentes regiões do Brasil determinados pela Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011)..... 21
- Quadro 2** – Micro-organismos esporulados termodúricos e/ou termofílicos isolados do leite em diversos países 27
- Quadro 3** – Gêneros e frequência de isolamento de bolores e leveduras no leite 29

LISTA DE TABELAS

Artigo A

- Tabela 1** – Contagem (log) de esporos aeróbios de 20 amostras de leite cru refrigerado da região de Castro, Paraná, coletadas no período de novembro de 2013 a maio de 2014 47
- Tabela 2** – Identificação por sequenciamento parcial e alinhamento de sequencias do gene 16S rRNA de 40 cepas de bactérias deteriorantes formadoras de esporos, isoladas do leite cru refrigerado produzido na região central do estado do Paraná entre novembro de 2013 e maio de 2014 com cepas depositadas no GenBank (*National Center for Biotechnology Information*)..... 51
- Tabela 3** – Potencial deteriorante de cepas de bactérias oriundas da germinação de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado da bacia leiteira da região de Castro, Paraná, coletadas no período de novembro de 2013 a maio de 2014 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Hart Infusion</i>
CYA	<i>Czapek Yeast Autolysate Agar</i>
DNA	Ácido desoxidorribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	Ácido clorídrico
h	Hora
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mm	Mili-mol
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Mili-molar
MM	Mega-molar
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCA	Plate Count Ágar
pmol	Pico-mol
STE	Solução sódio-Tris-EDTA
Seg	Segundos
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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	ESTADO DA ARTE	18
2.1	PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL	18
2.2	PRODUÇÃO DE LEITE NO ESTADO DO PARANÁ	19
2.3	QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO BRASILEIRO	20
2.4	DETERIORAÇÃO DO LEITE	22
2.4.1	Sacarolíticos	22
2.4.2	Proteolíticos	23
2.4.3	Lipolíticos	24
2.5	MICRO-ORGANISMOS TERMODÚRICOS	25
2.6	MICRO-ORGANISMOS ESPORULADOS	25
2.7	MICROBIOTA FÚNGICA NO LEITE	28
	REFERÊNCIAS	30
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	39
4	ARTIGO A – Isolamento e identificação de esporos aeróbios proteolíticos e lipolíticos do leite cru refrigerado	40
	RESUMO	40
	ABSTRACT	41
	INTRODUÇÃO	42
	MATERIAL E MÉTODOS	43
	Unidade amostral	43
	Tratamento e contagem de esporos aeróbios	43
	Potencial deteriorante e identificação morfo-colorimétrica das cepas	44
	Extração de DNA	44
	Amplificação do gene 16S rRNA	45
	Sequenciamento e análise das sequências	46

Análise estatística.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	56
5 ARTIGO B – Isolamento e identificação de fungos termodúricos proteolíticos de leite cru refrigerado	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
INTRODUÇÃO	64
MATERIAL E MÉTODOS	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	70
6 CONCLUSÃO	74
APÊNDICE	75
APÊNDICE A – Caracterização individual de colônias de bactérias proteolíticas e/ou lipolíticas formadoras de esporos isoladas do leite	76

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do leite cru refrigerado brasileiro ainda é um sério problema para o setor de lácteos. Enquanto a produção de leite vem aumentando no Brasil e no estado do Paraná (IBGE, 2014), as metas de melhoria da qualidade determinadas pela legislação brasileira (BRASIL, 2002; 2011) não estão sendo atingidas.

No Brasil, destacam-se algumas bacias leiteiras, como a bacia de Castro, localizada na região central do estado do Paraná, que é composta por propriedades altamente tecnificadas, cujo leite apresenta contagens totais de micro-organismos menores que 10 mil UFC/mL, o que atende aos padrões de qualidade internacionais, que determinam contagens máximas de até 100 mil Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (ESTADOS UNIDOS, 2003; UNIÃO EUROPEIA, 2004) previsto para o Brasil em 2016 (BRASIL, 2011).

A qualidade microbiológica do leite reflete-se diretamente no seu potencial tecnológico para indústria, uma vez que a deterioração dos constituintes do leite por parte dos micro-organismos determina alterações de rendimento e nas características sensoriais dos derivados lácteos (CELESTINO et al., 1997; CHEN et al., 2003; CASTRO et al., 2014). Existem três tipos de deterioração do leite conforme o componente utilizado no metabolismo microbiano: sacarolítico, proteolítico e lipolítico (JAY, 2000).

O metabolismo sacarolítico ocorre com maior facilidade no leite cru mantido em temperatura ambiente, sem armazenagem sob refrigeração (TRONCO, 2008), ou seja, pelos micro-organismos mesófilos.

A partir da refrigeração do leite, parte da microbiota mesófila pode passar por alterações metabólicas que permitem a utilização de outros substratos para sua multiplicação em temperaturas de refrigeração, os psicotróficos (SANTANA et al., 2001). O metabolismo psicotrófico utiliza-se principalmente de proteínas e/ou gordura do leite, sendo os micro-organismos chamados de proteolíticos e/ou lipolíticos, respectivamente. Como a refrigeração do leite é obrigatória no Brasil (BRASIL, 2011), a deterioração do leite é causada principalmente pela microbiota psicotrófica proteolítica e/ou lipolítica.

As enzimas proteolíticas de natureza bacteriana estão relacionadas a alterações tecnológicas durante a vida útil do leite *Ultra High Temperature* (UHT) (CELESTINO et al., 1997), como a sedimentação, enquanto as lipases são capazes de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta (CHEN et al., 2003). As enzimas proteolíticas e lipolíticas têm boa atividade em temperaturas de

refrigeração e apresentam termoestabilidade, não sendo inativadas durante a pasteurização ou tratamento por UHT do leite (CELESTINO et al., 1997).

As bactérias, que além de produzirem enzimas deteriorantes, apresentam resistência térmica, são de grande importância na deterioração do leite, pois continuarão a produzir enzimas no produto tratado termicamente (JAY, 2000). Assim, a deterioração do leite refrigerado é determinada pelas enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas no leite cru e pela microbiota proteolítica e lipolítica remanescente no leite pasteurizado.

O mais importante grupo de micro-organismos relacionado ao processo de deterioração do leite pasteurizado é o termodúrico (SCHELDEMAN et al., 2004; 2005; RANIERI et al., 2012). Esse grupo é formado por bactérias presentes no leite cru que resistem ao processo de pasteurização (JAY, 2000). Alguns podem ainda ser termofílicos (BUEHNER et al., 2014), ou seja, com a capacidade de multiplicação em altas temperaturas (JAY, 2000), como as temperaturas utilizadas em laticínios. Boa parte destes micro-organismos apresenta atividade proteolítica e/ou lipolítica no leite envazado (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2014a).

Os termodúricos são bactérias Gram positivas que podem resistir à pasteurização na forma vegetativa e parte deles produz esporos (JAY, 2000). Os esporos, principalmente dos micro-organismos dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* (SCHELDEMAN et al., 2004; RANIERI et al., 2012), são muito resistentes a processos térmicos intensos como o UHT (ESPEJO et al., 2014).

Outro importante grupo de micro-organismos que podem resistir à pasteurização e passar pelo controle de qualidade das indústrias são os fungos: bolores e leveduras, que também podem apresentar atividade deteriorante do leite pasteurizado (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2014c).

No controle de qualidade do leite cru nas indústrias não há determinação legal para contagem de fungos. Nas metodologias convencionais de contagem total de micro-organismos o tempo de incubação pode não ser suficiente para o crescimento de fungos. Parte desses micro-organismos, no entanto, pode apresentar características tecnológicas desejáveis, uma vez que conferem aspectos sensoriais característicos a alguns derivados (POTTIER et al., 2008), mas nenhum deles é desejável no leite fluido. No entanto, pouco se sabe sobre a presença de fungos no leite cru ou tratado termicamente, bem como sobre a sua resistência térmica, adaptabilidade às temperaturas de refrigeração e seu potencial deteriorante.

No Brasil e em outros países a produção e comercialização de leite UHT supera o leite pasteurizado, uma vez que os consumidores optam por um produto de maior

vida útil e que não necessite de refrigeração. Para as indústrias, questões logísticas também viabilizam a maior produção do leite UHT. No entanto, sabe-se que há uma relação direta entre a intensidade do tratamento térmico do leite e o comprometimento das suas características físico-químicas e biológicas (TRONCO, 2008). A pasteurização do leite (72 a 75°C por 15 seg) é um tratamento mais suave em relação ao processo UHT (130 a 150°C por 2 a 5 seg).

Assim, uma das formas de se estimular o consumo de leite pasteurizado seria a disponibilização de um produto de maior vida útil, como nos Estados Unidos, onde a vida útil do leite pasteurizado chega a 20 dias. Dessa forma, este trabalho atuou junto aos produtores da região de Castro, Paraná, onde o leite já possui excelente qualidade microbiológica, visando identificar os micro-organismos deteriorantes que poderiam comprometer a produção de leite pasteurizado de longa vida útil, dentre eles os micro-organismos formadores de esporos e a microbiota fungica que são aqui apresentados.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo quantificar esporos aeróbios, identificar as bactérias oriundas da sua germinação, bem como isolar fungos termodúricos, além de verificar a atividade proteolítica e/ou lipolítica desses micro-organismos e identifica-los por técnicas biomoleculares.

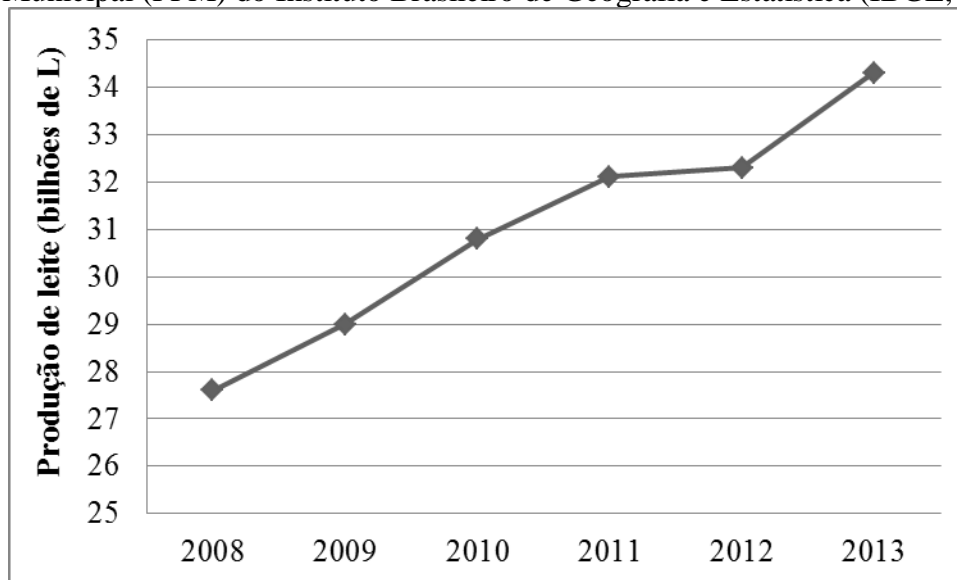
2 ESTADO DA ARTE

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

Atualmente o Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo, abaixo apenas dos Estados Unidos, Índia e China (FAO, 2013). A produção de leite no Brasil foi de 34,3 bilhões de litros em 2013 (IBGE, 2013). No entanto, entre outubro de 2013 e setembro de 2014 os estabelecimentos inspecionados brasileiros processaram 24,8 bilhões de litros (IBGE, 2014), demonstrando que o volume de leite informalmente comercializado no país pode chegar a quase um terço do total.

A produção leiteira vem aumentando no Brasil (IBGE, 2013), com um aumento de 20% entre 2008 e 2013, como demonstra a Figura 1.

Figura 1. Produção de leite no Brasil entre 2008 a 2013 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013).



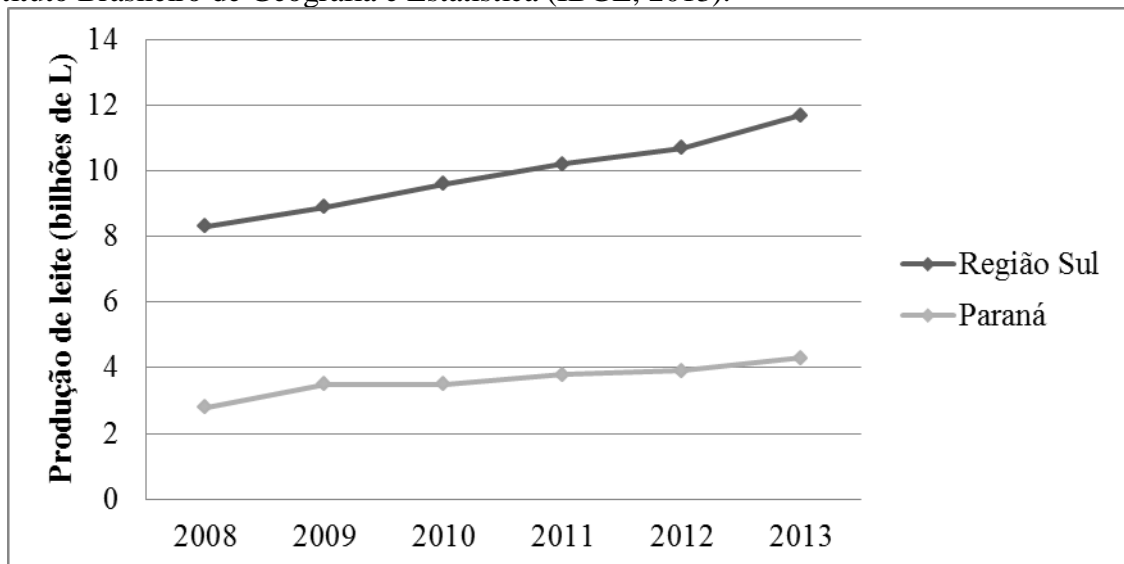
Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo o último censo agropecuário realizado pelo IBGE, em 2006, 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.

2.2 PRODUÇÃO DE LEITE NO ESTADO DO PARANÁ

A produção de leite do estado do Paraná acompanha a tendência de crescimento da região sul e do restante do Brasil, conforme pode ser observado na Figura 2, passando de 2,8 bilhões de litros em 2008 para 4,3 bilhões de litros em 2013 (IBGE, 2013), um aumento de 35%. O volume de leite processado pelos laticínios paranaenses inspecionados entre outubro de 2013 a setembro de 2014 foi de 2,9 bilhões de litros (IBGE, 2014).

Figura 2. Volume de leite processado pelos laticínios da região sul do Brasil e no estado do Paraná entre 2008 a 2013 de acordo com dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Há um contraste de produtividade e qualidade do leite no estado do Paraná entre os pequenos e grandes produtores (OHI et al., 2010). Ribeiro Júnior et al. (2015) evidenciaram que os pequenos produtores do estado do Paraná apresentam ordenha balde ao pé ou manual, tanque de imersão ou expansão comunitário, ou ainda, que não há refrigeração do leite. O volume diário médio é de 150 litros, com uma média de 52 de animais por propriedade, sendo 17 em lactação, predominando animais mestiços. Em nenhuma pequena propriedade estudada por esses autores foi observada a execução de boas práticas de higiene na ordenha. A maioria desses produtores também desenvolviam outras atividades agropecuárias nas propriedades. Já os grandes produtores do Paraná dedicam-se exclusivamente à bovinocultura leiteira, com ordenha mecânica canalizada e, até mesmo,

robotizada, tanque de expansão na propriedade, algumas com pré-resfriador em placa, e com produção diária média de 5.000 litros, com 450 bovinos da raça Holandesa ou Jersey puros registradas e 200 animais em lactação. Boas práticas de higiene na ordenha eram rotina em todas as 21 grandes propriedades leiteiras estudadas.

Essas diferenças de tecnificação entre as pequenas e grandes propriedades leiteiras do Paraná podem influenciar diretamente a qualidade do leite. Taffarel et al. (2013) comprovaram que sistemas de ordenha mecânica canalizada, com resfriador de leite a granel, proporcionam melhor qualidade microbiológica do leite em relação à ordenha mecanizada com balde ao pé ou manual e resfriamento em tanques de imersão.

2.3 QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO BRASILEIRO

A legislação brasileira vigente, que regulamenta o controle de qualidade do leite cru refrigerado, pasteurizado e tipo A, a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011) estabelece, assim como a Instrução normativa nº 51 (BRASIL, 2002), sua precursora, padrões de qualidade gradativamente mais rígidos para a melhoria da qualidade do leite (Quadro 1). No entanto, várias pesquisas demonstram que a qualidade do leite cru refrigerado produzido no Brasil não está acompanhando a progressão dos parâmetros determinados pela legislação (MATTOS et al., 2010; SILVA et al., 2011; BELOTI et al, 2012; RIBEIRO JÚNIOR et al, 2013; ANDRADE et al., 2014; MARTINS; REIS, 2014) sendo ainda um sério problema para o setor lácteo principalmente no que diz respeito à qualidade microbiológica (CASTRO et al., 2014).

Quadro 1. Progressão dos padrões de Contagem Padrão em Placas (CPP) de micro-organismos do leite cru refrigerado em diferentes regiões do Brasil determinados pela Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011).

Contagem Padrão em Placas (CPP)	Sul, Sudeste e Centro Oeste (UFC/mL)	Norte e Nordeste (UFC/mL)
Até 31/12/2011	7×10^5	
Até 31/12/2012		7×10^5
Até 30/06/2014	6×10^5	
Até 30/06/2015		6×10^5
Até 30/06/2016	3×10^5	
Até 30/07/2017		3×10^5
A partir de 01/07/2016	1×10^5	
A partir de 01/07/2017		1×10^5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Mattos et al. (2010) estudando a microbiota do leite cru refrigerado em Pernambuco, verificaram que 83% das propriedades leiteiras produziam leite com contagens microbiológicas superiores a 10^6 UFC/mL e evidenciaram a ausência de práticas de higiene na ordenha entre os produtores, bem como o predomínio da ordenha manual e a baixa frequência de refrigeração do leite. Andrade et al. (2014) avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado no Rio Grande do Norte e verificaram que a média da contagem bacteriana foi de 7×10^5 UFC/mL, quando o atual padrão determinado pela legislação para a região nordeste é 6×10^5 UFC/mL. Ribeiro Júnior et al. (2013) avaliando 99 amostras de leite cru refrigerado no estado do Paraná, encontraram média de $1,6 \times 10^6$ UFC/mL, com 63,2% das amostras com contagens superiores ao padrão determinado pela legislação (BRASIL, 2011) para a região sul na ocasião da análise, 6×10^5 UFC/mL.

Silva et al. (2011) verificaram que os pontos de contaminação microbiológica do leite são em ordem decrescente, a água residual do latão, fundo do latão, resfriador, tetos, três primeiros jatos, teteiras, balde e mãos do ordenhador. A falta de controle da contaminação microbiana do leite nesses pontos (MATTOS et al., 2010) é considerada a principal dificuldade ao atendimento dos parâmetros da legislação. A ausência de pagamento por qualidade do leite aos produtores também é relatada como um fator que desestimula a implantação de boas práticas na ordenha e a melhoria da qualidade do leite (BELOTI et al., 2012).

A bacia leiteira de Castro, região central do estado do Paraná é um exemplo da importância do pagamento por qualidade do leite. Nessa bacia, compreendida pelos municípios de Castro, Arapoti e Carambeí, os produtores estão inseridos em programas de

pagamento por qualidade do leite em diversas cooperativas, o que os estimula a trabalhar continuamente para a melhoria da qualidade de seu produto. Como resultado, os produtores produzem leite com menos de 10 mil UFC de aeróbios mesófilos por mL.

A qualidade microbiológica do leite cru é um fator determinante da qualidade e vida útil do leite fluido após o tratamento térmico (MONTANHINI, 2012). No Brasil, o leite pasteurizado não alcança 6 dias de vida útil, já nos Estados Unidos, por exemplo, onde o leite chega a ter durabilidade de 20 dias após a pasteurização, há uma preocupação não só com a quantidade de micro-organismos, mas com a composição da microbiota.

2.4 DETERIORAÇÃO DO LEITE

O leite por ser um alimento constituído por lactose, proteínas, lipídios, sais e água (SANTOS; FONSECA, 2007) é considerado um alimento completo e um meio de cultura favorável à multiplicação de muitos micro-organismos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Esses micro-organismos utilizam constituintes do leite como substrato para sua multiplicação, deteriorando o leite. Podem ser divididos em três grupos de acordo com o metabolismo predominante: sacarolíticos, proteolíticos e lipolíticos.

2.4.1 Sacarolíticos

Os micro-organismos que utilizam a lactose do leite como seu substrato pertencem ao grupo dos sacarolíticos, ou seja, utilizam-se de carboidratos para obtenção de energia (JAY, 2000). A degradação da lactose pelos micro-organismos é realizada pela enzima β -D-galactosidase (lactase), que catalisa a reação de hidrólise da lactose em β -D-galactose e α -D-glicose. A temperatura ótima dessa enzima é de 35°C e pH de 6,9 a 7,3. Como a temperatura ótima da lactase é alta e exige alta energia de ativação, o metabolismo sacarolítico é favorecido quando o leite não é refrigerado, ou seja, mantido em temperatura ambiente após a ordenha (ANDRADE, 2005).

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

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

2.4.2 Proteolíticos

A refrigeração do leite controla a multiplicação dos micro-organismos mesófilos, predominantemente sacarolíticos. No entanto, alguns desses micro-organismos podem ativar vias metabólicas alternativas, adaptando-se ao crescimento em temperaturas de refrigeração independentemente da sua temperatura ótima de multiplicação (SANTANA et al., 2001). Esses micro-organismos são chamados de psicrotróficos.

Os psicrotróficos utilizam-se de vias metabólicas secundárias para obtenção de energia, através da degradação de proteínas e lipídios, principalmente (SANTANA et al., 2001). Os micro-organismos que utilizam proteínas e lipídios são chamados de proteolíticos e lipolíticos, respectivamente.

No leite, as enzimas proteolíticas de natureza bacteriana agem, em sua maioria, sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite, de forma análoga à quimosina (FAIRBAIRN; LAW, 1986; RECIO et al., 2000). Esta categoria de enzimas está relacionada a problemas tecnológicos, incluindo a sedimentação e geleificação do leite UHT, a formação de aminoácidos indesejáveis durante a maturação de queijos e o desenvolvimento de sabor amargo em leite e em produtos lácteos (CELESTINO et al., 1997).

O controle da microbiota psicrotrófica no leite constitui um fator importante para assegurar a qualidade de produtos lácteos. Pesquisas anteriores mostram que a contaminação do leite por bactérias psicrotróficas proteolíticas é frequente (MOREIRA; MONTANHINI, 2014). Adams et al. (1975) observaram a presença de bactérias psicrotróficas produtoras de proteases resistentes ao tratamento térmico de 149°C, por 10 segundos, em 90% das amostras de leite cru avaliadas.

Adams et al. (1976) registraram um decréscimo de 10 a 20% na concentração de κ -caseína, após dois dias de estocagem a 5°C, na presença de 10⁵ UFC/mL de *Pseudomonas sp.*, considerado o principal gênero de bactérias proteolíticas (JAY, 2000). Embora sejam psicrotróficas e muito sensíveis aos tratamentos térmicos, as proteases de *Pseudomonas sp.* podem ser estáveis a altas temperaturas e resistentes à pasteurização e ao tratamento UHT, entretanto não são ativas acima de 50 a 60°C. Além das *Pseudomonas*,

bactérias Gram positivas como as dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* são importantes produtoras de proteases, com o agravante de serem termodúricas e esporuladas, apresentando formas sobreviventes aos tratamentos térmicos (SCHELDEMAN et al., 2004).

Além dos psicrotróficos, Gillis et al. (1985) constataram uma diferença significativa no grau de proteólise entre amostras de leite cru com diferentes contagens de micro-organismos mesofílicos. Nas amostras com contagem total inferior a 10^4 UFC/mL, foi verificado um grau de proteólise significativamente menor quando comparado às amostras com contagem padrão entre 10^5 UFC/mL e 10^6 UFC/mL.

2.4.3 Lipolíticos

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

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

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

Alguns gêneros de bactérias têm sido utilizados para a produção de lipases com potencial biotecnológico, como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (ARPIGNY; JAEGER, 1999).

Assim, a deterioração de amostras de leite cru refrigerado ou tratado termicamente, mantidas sob refrigeração, ocorre principalmente em função da atividade de proteases e lipases, enzimas termoestáveis e que, portanto, não são inativadas por tratamentos térmicos como a pasteurização ou tratamento UHT. Estas enzimas permanecem ativas no

produto embalado e promovem sua degradação. Assim, há uma estreita relação entre a carga de micro-organismos produtores de enzimas deteriorantes no leite cru e a vida útil dos produtos tratados termicamente.

2.5 MICRO-ORGANISMOS TERMODÚRICOS

Além das enzimas, a vida útil do leite pasteurizado está diretamente relacionada com a quantidade de micro-organismos termodúricos mesófilos e termodúricos psicrotróficos, que além de importantes produtores de enzimas deteriorantes, são resistentes à pasteurização, passando a compor a microbiota remanescente no leite pasteurizado (JAY, 2000; FUQUAY et al., 2011). Apresentam propriedades termodúricas bactérias dos gêneros *Micrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, entre outros. Parte desses termodúricos, podem ainda produzir esporos, que também podem contaminar o leite (BUEHNER et al., 2014).

Nos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration* (FDA) declarou que termodúricos, termófilos, psicrotróficos e bactérias formadoras de esporos constituem a maior ameaça à deterioração de produtos lácteos (HULL et al., 1992; RÜCKERT et al., 2004). Bactérias termodúricas e esporuladas resistem ao processo de pasteurização (GLEESON et al., 2013) e podem apresentar atividade proteolítica e lipolítica reduzindo a vida útil do leite pasteurizado.

2.6 MICRO-ORGANISMOS ESPORULADOS

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

São descritos mais de 200 genes envolvidos com o processo de esporulação, principalmente o gene *rpoB* (650 pares de bases) (BUEHNER et al., 2014) e o *spo0A* (300 pb) (RUECKERT et al., 2006). Os endosporos são metabolicamente inertes, possuem parede celular espessa, apresentam 10% da quantidade de água das células vegetativas e são resistentes ao calor, dessecação, radiação e compostos químicos tóxicos (desinfetantes) (MADIGAN et al., 2010; TORTORA et al., 2013).

No leite cru, os esporos de *Bacillus* e *Clostridium* estão presentes. No entanto, os esporos de bactérias aeróbias especialmente têm maior interesse por ser a

aerobiose a condição verificada no leite fluido e na maioria dos seus derivados (SCHELDEMAN et al., 2004). Os esporos compõem a microbiota do leite pasteurizado e são especialmente significativos em leite em pó, devido ao efeito de concentração (HILL; SMYTHE, 2012). Os esporos são altamente resistentes ao calor e podem sobreviver ao processamento UHT (ESPEJO et al., 2014).

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

Além de termodúricos, alguns micro-organismos formadores de esporos possuem a capacidade de multiplicação em altas temperaturas são portanto termofílicos (JAY, 2000; FUQUAY et al., 2011). Esses micro-organismos e seus esporos têm fundamental importância para a indústria de laticínios, uma vez que podem se aderir em placas de pasteurização, contaminar o leite ali processado e resistir ao processo de limpeza e sanitização dos sistemas (BUEHNER et al., 2014).

No quadro 2 é possível observar as espécies de micro-organismos esporulados termodúricos e/ou termofílicos e suas respectivas frequências de isolamento no leite relatadas na literatura.

Quadro 2. Micro-organismos esporulados termodúricos e/ou termofílicos isolados do leite em diversos países.

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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os esporos destes micro-organismos são facilmente encontrados no solo e em alimentos para os animais, como por exemplo na silagem (BUEHNER et al., 2014). Contaminam o leite durante e após a ordenha e podem germinar ou permanecer na forma de esporos. Os esporos resistem aos tratamentos térmicos e esse processo pode estimular sua germinação. Assim, são importantes no processo de deterioração do leite pasteurizado (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2014b) de longa vida útil e no leite UHT.

2.7 MICROBIOTA FÚNGICA NO LEITE

Os fungos são micro-organismos eucariontes heterotróficos que obtêm sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar diversos nichos ecológicos, atuando como parasitas, sapróbios ou então estabelecendo relações simbióticas, por exemplo, com algas, formando os líquens (TORTORA et al., 2013).

Nos fungos, a estrutura celular é semelhante a dos outros eucariotos, constituída basicamente por uma membrana, um citoplasma com as organelas distribuídas aleatoriamente por todo interior celular e um compartimento especial, o núcleo, que armazena o material genético. As células podem ser encontradas na forma unicelular, como as leveduras, ou então formando conjuntos de hifas, septadas ou não, denominadas de micélio, como no caso dos fungos filamentosos. Tanto as células leveduriformes quanto o micélio estão envolvidos por uma camada protetora externa denominada de parede celular, quimicamente diferente da parede encontrada em vegetais, ainda que possa exercer os mesmos tipos de funções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

No grupo dos micro-organismos termotóxicos do leite, além de bactérias, podem ser isolados fungos que também podem crescer em temperaturas de refrigeração e produzir proteases (SØRHAUG et al., 2011). Alguns desses podem apresentar características tecnológicas desejáveis, uma vez que conferem aspectos sensoriais característicos a alguns derivados (POTTIER et al., 2008), mas podem também ser deteriorantes ou produtores de micotoxinas.

Alguns gêneros de fungos, como *Cândida*, *Geotrichum*, *Rhizopus* e *Thermomyces* vem chamando a atenção de vários pesquisadores pelo seu potencial biotecnológico para a produção de lipases industriais (ARPIGNY; JAEGER, 1999; FUQUAY et al., 2011).

Apesar de poucos relatos disponíveis, alguns gêneros de fungos isolados do leite tem sido descritos como mostra o Quadro 3.

Quadro 3. Gêneros e frequência de isolamento de bolores e leveduras no leite.

Estudo	País	Gênero	(n)	(%)
Jodral et al. (1993)	Espanha	<i>Geotrichum</i>	23	76,5
		<i>Fusarium</i>		45,3
		<i>Aspergillus</i>		31,2
Torkar e Vengust (2008)	Eslovênia	<i>Geotrichum</i>	68	51,5
		<i>Aspergillus</i>		33,8
		<i>Mucor</i>		5,9
		<i>Fusarium</i>		2,9
		<i>Penicillium</i>		2,9
Ruz Peres et al. (2010)	Brasil	<i>Candida</i>	302	59
		<i>Geotrichum</i>		11,6
		<i>Rhodotorula</i>		10,9
		<i>Penicillium</i>		2,6
		<i>Chrysosporium</i>		2,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ruz Peres et al. (2010) compararam a resistência de fungos filamentosos e leveduras à pasteurização rápida (72°C / 20 segundos), lenta (65°C / 30 minutos) e a fervura (98°C) do leite, e verificaram que o processo de pasteurização rápida foi o tratamento térmico no qual houve o maior índice de resistência (72,18%) por parte das leveduras e fungos filamentosos testados, seguido pela fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%). Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que 77,14% dos 35 isolados de *Geotrichum* foram resistentes à pasteurização rápida e nenhum à pasteurização lenta do leite.

Geotrichum, o principal gênero de fungos isolado do leite em outros países (JODRAL et al., 1993; TORKAR; VENGUST, 2008) é uma levedura cuja presença é desejável na superfície de alguns queijos (ELISKASES LECHNER et al., 1997). É utilizado como fermento na indústria de laticínios e coloniza quase todos os queijos curados por superfície durante os primeiros estágios de maturação (BERGER et al., 1999) conferindo textura, coesão e espessura da casca (BOUTROU; GUÉGUEN, 2005) além de compostos aromáticos característicos de alguns queijos (JOLLIVET et al., 1994). Essas características nos queijos ocorrem, principalmente, devido à produção de proteases extracelulares pelas cepas de *Geotrichum* (BOUTROU et al., 2002).

A deterioração de produtos lácteos por fungos está associada principalmente com queijos e sua suscetibilidade depende de várias condições, como o saneamento durante a fabricação e maturação (tempo e grau), as condições de armazenamento (temperatura, umidade relativa do ar, tipo e extensão da embalagem), atividade da água (a_w) e composição do queijo (SØRHAUG, 2011).

Alguns já avaliaram o potencial antagonista de bactérias ácido lácticas frente aos fungos produtores ou não de micotoxinas nos produtos lácteos (BELKACEM HANFI et al., 2014; CHEONG et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre a presença de fungos no leite fluido, sua identidade, resistência térmica, adaptabilidade às temperaturas de refrigeração e seu potencial deteriorante.

REFERENCIAS

ADAMS, D. M., BARACH, J. T., SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science** 58, 828-835, 1975.

ADAMS, D. M., BARACH, J. T., SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science** 59, 823-827, 1976.

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.

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

BELKACEM HANFI, N., FHOULA, I., SEMMAR, N., GUESMI, A., PERRAUD GAIME, I., OUZARI, H. I., BOUDABOUS, A., ROUSSOS, S. Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. **Biological Control** 76, 52-59, 2014.

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, 5-10, 2012.

BERGER, C., KHAN, J.A., MOLIMARD, P., MARTIN, N., SPINLER, H.E. Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. **Applied and Environmental Microbiology** 65, 5510-5514, 1999.

BOUTROU, R., FAMELART, M.H., GAUCHERON, F., LE GRAET, Y., GASSI, J.Y., PIOT, M., LEONIL, J. Structure development in a soft cheese curd model during manufacture in relation to its biochemical characteristics. **The Journal of Dairy Research** 69, 605-618, 2002.

BOUTROU, R., GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology** 102, 1-20, 2005.

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

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

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

CASTRO, K. A., SILVA, K. A. L., PEREIRA, A. I. A., ORSINE, J. V. C. Efeito da contagem de células somáticas sobre a qualidade dos queijos prato e mussarela, **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** 8, 1237-1250, 2014.

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.

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.

CHEONG, E. Y. L., SANDHU, A., JAYABALAN, J., LE, T. T. K., NHIEP, N. T., HO, H. T. M., ZWIELEHNER, J., BANSAL, N., TURNER, M. S. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. **Food Control** 46, 91-97, 2014.

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

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

ELISKASES LECHNER, F., KOSSLER, A., GINZINGER, W. The incidence and characterization of *Geotrichum* sp. in cheese. **Deutsche Molkerei-Zeitung, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft**, 118, 56-61, 1997.

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

ESTADOS UNIDOS. **Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance (2003 Revision): Standards for Grade "A" milk and milk products.** Silver Spring: FDA - United States Food and Drugs Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Section 7, 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ear/pmo03-2.html>>. Acesso em: 31 de dezembro de 2014.

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

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: 25 de dezembro de 2014.

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

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

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

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.

GLEESON, D., CONNELL, A., JORDAN, K. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. **Irish Journal of Agricultural and Food Research** 52, 217-227, 2013.

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo agropecuário de 2006**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Pecuária Municipal de 2013**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ppm/default.asp>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estatística da produção pecuária em 2014 – Pesquisa trimestral do Leite**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1086&z=t&o=24>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2014.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology** (6th ed.) New York: Chapman and Hall, pp. 701, 2000.

JODRAL, M., LINAN, E., ACOSTA, I., GALLEGRO, C., ROJAS, F., BENTABOL, A. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **International Journal of Food Microbiology** 18, 171-174, 1993.

JOLLIVET, N., CHATAUD, J., VAYSSIER, Y., BENSOUSSAN, M., BELIN, J. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum*, **Journal of Dairy Research** 61, 241-248, 1994.

JUNQUEIRA, J., CARNEIRO, L. C. **Biologia Celular e Molecular** (9^a ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 302, 2012.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock** (12^a ed.) São Paulo: Artmed, pp. 1160, 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** 8, 1348-1359, 2014.

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.

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

MONTANHINI, T. M. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Bacillus cereus* isolado em produtos lácteos com relação ao seu comportamento psicrotrófico**, Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, UFPR, Curitiba-PR, 80f., 2012.

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

POTTIER, I., GENTE, S., VERNOUX, J.P., GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International Journal of Food Microbiology** 126, 327-332, 2008.

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

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

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

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

RIBEIRO JÚNIOR, J. C., TAMANINI, R., ARAÚJO, J. P. A., YAMADA, A. K., ANTONIO, N. S., BELOTI, V.. Micro-organismos termodúricos psicrotróficos com atividade proteolítica em leite cru refrigerado, in **Anais do VI Sul Leite - Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, Maringá, Paraná, 2014a. CD-room.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C., GONZAGA, N., MAREZE, J. TAMANINI, R., BELOTI, V. Microbiota esporulada aeróbia com atividade proteolítica e lipolítica em leite cru refrigerado, in **Anais do VI Sul Leite - Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, Maringá, Paraná, 2014b. CD-room.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C., BELOTI, V., MASSI, F. P., FERRANTE, L. S.; DANIEL, G. C., AUGUSTO, N. A. Identificação de bolores termodúricos proteolíticos de leite cru refrigerado, in **Anais do 41º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, Rio Grande do Sul, 2014c. CD-room.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C., SILVA, L. C. C., TAMANINI, R., BELOTI, V. Qualidade do leite produzido por pequenos e grandes produtores. **Semina: Ciências Agrárias** 36, 7-20, 2015.

RUECKERT, A., RONIMUS, R. S., MORGAN, H. W. Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, *spo0A*, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. **Food Microbiology** 23, 220-230, 2006.

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

RUZ PERES, M., BENITES, N.R., YOKOYA, E., MELVILLE, P.A. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Veterinária e Zootecnia** 17, 62-70, 2010.

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

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

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

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

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

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

- SØRHAUG, T. Spoilage Molds in Dairy Products. In: Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (2nd ed.). London: Elsevier, 780-785, 2011.
- TAFFAREL, L. E., COSTA, P. B., OLIVEIRA, N. T. E., BRAGA, G. C., ZONIN, W. J. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento, **Arquivos do Instituto Biológico** 80, 7-11, 2013.
- TORKAR, K.G., VENGUŠT, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control** 19, 570-577, 2008.
- TORP, M., HOLSTAD, G., GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*: feeds and feces as major contamination sources in milk on a dairy farm. **Norsk Veterinærtidsskrift** 113, 462-466, 2001.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiology: an introduction** (11th), Yorkshire: Pearson, 975 pp., 2013.
- TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite** (3^a ed.) Santa Maria: UFSM, 206 pp., 2008.
- UNIÃO EUROPEIA. Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. **Official Journal of the European Union**, 29 April 2004. Disponível em: <[http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg853_2004\(1\).pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg853_2004(1).pdf)>. Acesso em: 31 de dezembro de 2014.
- VISSERS, M. M. M., DRIEHUIS, F., GIFFEL, M. T., JONG, P., LANKVELD, J. M. G. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. **Journal of Dairy Science**, 90, 928-936, 2007.
- YUAN, D. D., LIU, G. C., REN, D. Y., ZHANG, D., ZHAO, L., KAN, C. P., YANG, Y. Z., MAA, W., LI, Y., ZHANG, L. B. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. **Food Control** 25, 752-757, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar e identificar os esporos aeróbios, isolar e identificar a microbiota termodúrica fúngica, e verificar o potencial deteriorante desses micro-organismos do leite cru refrigerado na bacia leiteira da região de Castro, Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Quantificar a microbiota esporulada aeróbia do leite cru refrigerado produzido na região de Castro, Paraná.
- 3.2.2 Verificar a atividade proteolítica e/ou lipolítica dos isolados de esporos aeróbios do leite cru refrigerado.
- 3.2.3 Identificar as cepas de micro-organismos esporulados proteolíticas e/ou lipolíticas por sequenciamento do gene 16S rRNA.
- 3.2.4 Realizar análises filogenéticas com as sequências de rRNA de bactérias oriundas da germinação de esporos aeróbios.
- 3.2.5 Isolar colônias fúngicas do leite cru refrigerado que tenham resistência térmica.
- 3.2.6 Verificar a atividade proteolítica de fungos isolados do leite cru refrigerado.
- 3.2.7 Identificar os fungos termodúricos proteolíticos.

4 ARTIGO A

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPOROS AERÓBIOS PROTEOLÍTICOS E LIPOLÍTICOS DO LEITE CRU REFRIGERADO

RESUMO

Esporos de bactérias aeróbias constituem um importante grupo de micro-organismos no leite cru, uma vez que são termodúricos e, nas formas vegetativas, termofílicos, termodúricos e/ou psicrotróficos, e podem deteriorar o leite pasteurizado reduzindo sua vida útil. No Brasil, não há estudos sobre a carga de esporos aeróbios no leite cru, tão pouco sobre sua atividade deteriorante. O presente trabalho teve como objetivo quantificar os esporos aeróbios no leite cru refrigerado brasileiro, verificar o potencial proteolítico e/ou lipolítico dos isolados e proceder a identificação dos micro-organismos oriundos da sua germinação. Foram avaliadas 20 amostras de leite cru refrigerado oriundas de propriedades leiteiras da bacia leiteira de Castro, região central do Paraná. A contagem foi realizada por plaqueamento das amostras após tratamento térmico a 80°C/12min; o potencial proteolítico e lipolítico dos isolados foi avaliado pelo repique em ágar leite e em ágar tributirina, respectivamente; e a identificação desses micro-organismos foi realizada por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA comparando as sequências encontradas com as depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As contagens de esporos aeróbios variaram de 1 a 3,7 log UFC.mL⁻¹, com média de 1,75 (±0,59) log UFC.mL⁻¹. A partir da germinação dos esporos, foram obtidos 137 isolados puros de bactérias aeróbias, das quais 40 (29,2%) apresentaram atividade deteriorante do leite. Dessas, 31 (77,5%) foram proteolíticas e lipolíticas, 7 (17,5%) foram exclusivamente lipolíticas e 2 (5%) foram apenas proteolíticas. Pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, foram identificados *Bacillus licheniformis* (55%), *Bacillus sp.* (27,5%), *Paenibacillus sp.* (7,5%), *Bacillus pumilus* (5%), *Bacillus circulans* (2,5%) e *Brevibacillus sp.* (2,5%). Estudos da microbiota do leite cru brasileiro ainda não haviam descrito *B. circulans* e o gênero *Paenibacillus*, frequentemente detectado no leite de outros países. Dos 22 isolados de *B. licheniformis*, 21 (95,5%) apresentaram atividade proteolítica e lipolítica e 1 (4,5%) foi apenas proteolítico. As 2 cepas de *B. pumilus* foram proteolíticas e lipolíticas, enquanto a cepa de *B. circulans* foi apenas lipolítica. Em relação aos 11 isolados de *Bacillus sp.*, 8 (72,7%) foram proteolíticos e lipolíticos, 1 (9,1%) foi proteolítico e outros 2 (18,2%) lipolíticos. As 3 cepas de *Paenibacillus sp.* foram apenas lipolíticas, assim como a cepa de *Brevibacillus sp.* O leite pode ser contaminado por esporos a partir do solo, alimentos dos animais, água, fezes, tetos e equipamento de ordenha, fazendo-se necessárias medidas profiláticas que controlem a contaminação nesses pontos para melhorar a qualidade microbiológica e, conseqüentemente, ampliar a vida útil do leite pasteurizado, uma vez que um terço desses micro-organismos apresentam atividade proteolítica e/ou lipolítica.

Palavras-chave: *Bacillus*, esporos, lipólise, proteólise, termodúricos

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SPORE-FORMING BACTERIA PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC FROM REFRIGERATED RAW MILK

ABSTRACT

Spores of aerobic bacteria are an important group of microorganisms in raw milk, since they are thermophilic and vegetative forms are thermophilic, thermophilic and / or psychrotrophic and can spoilage pasteurized milk reducing its shelf-life. In Brazil, there are no studies on the load of aerobic spores in raw milk, so little about his spoilage activity. Thus, this study aimed to evaluate and quantify the aerobic spores in raw brazilian refrigerated milk, check the potential proteolytic and/or lipolytic of isolated and carry out the identification of microorganisms derived from the germination. Twenty milk samples of dairy farms of Castro region, Paraná, Brazil, were evaluated counting was carried out by plating the samples after heat treatment at 80°C/12 min, proteolytic and lipolytic potential of the isolates was assessed in milk agar and tributyrin agar, respectively, and the identification of these microorganisms was realized by partial sequencing data of the 16S rRNA and comparison with the sequences deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Aerobic spore counts ranged from 1 to 3.7 CFU.mL⁻¹ log, with a mean of 1.75 (\pm 0.59) log CFU.mL⁻¹. After germination of the spores were obtained pure 137 isolates of aerobic bacteria, of which 40 (29.2%) showed milk spoilage activity. Of these, 31 (77.5%) were proteolytic and lipolytic, 7 (17.5%) were exclusively lipolytic and 2 (5%) were only proteolytic. For the 16S rRNA sequencing were identified *Bacillus licheniformis* (55%), *Bacillus sp.* (27.5%), *Paenibacillus sp.* (7.5%), *Bacillus pumilus* (5%), *Bacillus circulans* (2.5%) and *Brevibacillus sp.* (2.5%). Brazilian studies about microbiota of raw milk not yet described the genus *B. circulans* and *Paenibacillus*, that is frequently detected in milk from other countries. Of the 22 isolates of *B. licheniformis*, 21 (95.5%) showed proteolytic and lipolytic activity and 1 (4.5%) was only proteolysis. The 2 strains of *B. pumilus* are proteolytic and lipolytic while the strain of *B. circulans* was only lipolytic. Of the 11 isolates of *Bacillus sp.*, 8 (72.7%) were proteolytic and lipolytic, 1 (9.1%) was proteolytic and other 2 (18.2%) lipolytic. The 3 strains of *Paenibacillus sp.* were just lipolytic as well as the strain of *Brevibacillus sp.* Milk can be contaminated by spores from the soil, animal food, water, feces, ceilings and milking equipment, making it necessary preventive measures to control contamination at these points to improve the microbiological quality and thus extend the shelf-life pasteurized milk, since one third of these micro-organisms have proteolytic and/or lipolytic activity.

Key words: *Bacillus*, spores, lipolysis, proteolysis, thermophilic

INTRODUÇÃO

No Brasil, em geral, o leite cru refrigerado apresenta baixa qualidade microbiológica (MATTOS et al., 2010; SILVA et al., 2011; BELOTI et al., 2012; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; MARTINS; REIS, 2014), o que determina vida útil do leite pasteurizado inferior à 6 dias. No entanto, determinadas bacias leiteiras brasileiras produzem leite com qualidade microbiológica que atende a todos os padrões de qualidade internacionais (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2015), com potencial de produção de leite pasteurizado de longa vida útil, de até 20 dias como nos Estados Unidos. Nesse contexto, controlar a microbiota que poderia reduzir a vida útil do leite pasteurizado brasileiro é uma das medidas para que o consumidor disponha de leite pasteurizado de longa vida útil e melhor qualidade nutricional.

No leite cru, a microbiota esporulada aeróbia é comumente presente, especialmente espécies de *Bacillus* (SCHELDEMAN et al., 2004; 2005), e representa um problema para o setor de laticínios, uma vez que os esporos bacterianos conferem resistência ao processo de pasteurização (BUEHNER et al., 2014). Dessa forma, esses micro-organismos compõem a microbiota do leite pasteurizado, juntamente com os micro-organismos termodúricos não esporulados e os contaminantes pós-pasteurização (JAY, 2000).

Os esporos são muito resistentes ao calor podendo sobreviver à pasteurização e ao processamento *Ultra High Temperature* (UHT) (ESPEJO et al., 2014). Alguns desses micro-organismos têm a capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração (HULL et al., 1992) e podem ser capazes de deteriorar o leite pasteurizado envazado durante sua vida útil (SCHELDEMAN et al., 2004; RANIERI et al., 2012).

Alguns micro-organismos formadores de esporos possuem a capacidade de multiplicação em altas temperaturas sendo, portanto, termofílicos (BURGESS et al., 2010; YUAN et al., 2012; GLEESON et al., 2013). Esses micro-organismos têm fundamental importância para a indústria de laticínios, uma vez que podem aderir a placas de pasteurização, contaminar o leite ali processado e resistirem ao processo de limpeza e sanitização dos sistemas (BURGESS et al., 2010).

As altas temperaturas aplicadas ao leite cru durante o processamento na indústria é um dos fatores que podem estimular a germinação dos esporos de bactérias (JAY, 2000). Assim, esses micro-organismos são importantes componentes da microbiota do leite pasteurizado e *Ultra High Temperature* (UHT) (SCHELDEMAN et al., 2004; RANIERI et

al., 2012), podendo ser degradados pelas formas vegetativas dos esporos, com consequente redução da sua vida útil.

No Brasil, não existem estudos sobre a contaminação do leite cru refrigerado por esporos de bactérias, tão pouco sobre seu potencial deteriorante. Diante disso, esse estudo teve por objetivo verificar a contagem de esporos de bactérias aeróbias no leite cru refrigerado produzido no estado do Paraná, região sul do Brasil, além de avaliar o potencial proteolítico e lipolítico desses micro-organismos e identificar geneticamente essa microbiota.

MATERIAL E MÉTODOS

Unidade amostral

Foram avaliadas 20 amostras de leite cru refrigerado produzido nos municípios de Castro ($n = 14$) e Arapoti ($n = 6$), região central do estado do Paraná. Todas as propriedades selecionadas para o presente trabalho eram muito tecnificadas com uma produção diária média que variava de 5 a 29 mil litros/dia. Todos os animais em lactação eram mantidos em *free-stall* com cama de areia ou serragem, onde eram alimentados com silagem de milho, concentrado proteico comercial e sal mineral. A água de todas as propriedades era oriunda de poços artesianos próprios, a ordenha era realizada em circuito fechado, sendo uma robotizada, e em seis propriedades o leite cru passava por resfriador em placas antes de ser armazenado em tanques de expansão.

Amostras de 500 mL de leite cru refrigerado foram coletadas assepticamente diretamente dos tanques de expansão das propriedades rurais no período de novembro de 2013 a maio de 2014, sendo transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde procedeu-se as análises. As amostras foram avaliadas para contagem de esporos aeróbios em menos de 4 horas após a coleta.

Tratamento e contagem de esporos aeróbios

A contagem de esporos aeróbios do leite foi realizada conforme o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (FRANK; YOUSSEF, 2004). Duzentos mL

de cada amostra foram depositados em um balão volumétrico estéril, mantido em banho-maria a $80 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 12 min. Este tratamento elimina as formas vegetativas e estimula a germinação de esporos. Iniciou-se a contagem do tempo de tratamento térmico das amostras após um balão controle, equipado com termômetro e com o mesmo volume de leite, atingiu a temperatura desejada. Durante todo o período de tratamento os balões foram mantidos sob agitação.

Após o tratamento, foram realizadas diluições decimais seriadas (até 10^{-2}) das amostras em solução salina (0,85%) peptonada (0,1%), realizando-se o plaqueamento por superfície (0,1 mL) em ágar padrão para contagem (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) suplementado com 0,1% de amido solúvel (Synth, Brasil). O plaqueamento foi realizado em duplicata para cada diluição. As placas foram então invertidas e incubadas por 48 h a 32°C .

Potencial deteriorante e identificação morfocolorimétrica das cepas

Imediatamente após a contagem de colônias oriundas da germinação dos esporos, todas foram repicadas para ágar leite (Acumedia, Baltimore, USA) suplementado com solução estéril de leite em pó desnatado reconstituído à 10% na proporção de 9:1 e em ágar tributirina (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com tributirina (Himedia, Mumbai, Índia) na proporção de 99:1 para verificação da atividade proteolítica (BEERENS; LUQUET, 1990) e lipolítica (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007), respectivamente.

As colônias de bactérias formadoras de esporos que apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica foram fixadas pelo calor em laminas de microscopia óptica para identificação morfocolorimétrica pela coloração de Gram (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012) e cultivadas em caldo cérebro coração (BHI) (Acumedia, Baltimore, USA) por 24 horas a 35°C para extração de DNA.

Extração de DNA

O processo de extração de DNA foi realizado conforme Cheng e Jiang (2006). Um mL do caldo de cultura foi adicionado a um microtubo de centrifugação descartável de 2 mL livre de DNase, RNase e pirogênios. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 2 min a 4°C , sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspendido em homogeneizador com 400 μL de tampão Sódio-Tris-EDTA (STE) [Tris-

HCl(10MM):EDTA(1mM):NaCl(100MM)] sendo novamente centrifugados a 12.000 rpm por 2 min a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Foram então adicionados 200 µL de tampão Tris-EDTA (TE) [Tris-HCl(10MM):EDTA(1mM)], homogeneizados e adicionados 100 µL de fenol saturado equilibrado (pH 8,0) (Sigma) com agitação em homogeneizador por 1 min e centrifugação a 16.000 rpm por 5 min a 4°C. Então procedeu-se a lavagem do material genético: 160 µL do sobrenadante foram transferidos a um microtubo de centrifugação limpo e adicionados de 40 µL de TE e 100 µL de clorofórmio (Synth, Brasil). O processo de lavagem foi realizado por 2 vezes, no mínimo, ou até que não se observasse a interface branca. Cento e sessenta µL foram recolhidos do sobrenadante da ultima lavagem e foram adicionados 40 µL de TE e 5 µL de RNase (10 mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e os microtubos foram incubados a 37°C por 20 min em termo bloco. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de clorofórmio aos microtubos, que foram centrifugados a 16.000 rpm por 5 min a 4°C. Parte do sobrenadante (150 µL) foi transferido a um microtubo de centrifugação limpo e estocado a -20°C.

Amplificação do gene 16S rRNA

Para as análises moleculares de todos os isolados de bactérias oriundas da germinação de esporos com atividade proteolítica e/ou lipolítica foi realizada a amplificação parcial do gene 16S rRNA (1500 pb) por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com os *primers forward* Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAAC-GCTGGCGGC-3') e *reverse* Y3 (5'-CTGACCCCACTTC-AGCATTGTTCCAT-3'), previamente descritos por Chen et al. (2000). A reação foi realizada utilizando-se 1 µL de amostra (50 ng/mL), 39 µL de água ultrapura esterilizada; 1 µL de dNTPs (10 mmol L⁻¹ de cada); 5 µL de tampão 10X; 1,5 µL de MgCl₂ (50 mmol L⁻¹); 1 µL de cada primer (Y1 e Y3, na concentração de 20 pmol µL⁻¹); 0,5 µL de *Taq Platinum* DNA polimerase (5 U µL⁻¹) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com volume final de 50 µL.

A amplificação foi realizada em termocilador (AerisTM Thermal Cycler, Esco[®] Micro Pte, Singapore) utilizando-se uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 64°C por 45 seg, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 5 min, conforme descrito por Young et al. (1991) com modificações.

Para visualização da PCR as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e submetidas por 1 h 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 min e visualizados em transiluminador UV.

Sequenciamento e análise das sequências

A purificação do produto da PCR foi realizada por meio 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.

O sequenciamento em ambas as direções do gene rRNA amplificado de todos os isolados de bactérias oriundas da germinação de esporos com atividade proteolítica e/ou lipolítica foi realizado utilizando-se o Kit comercial *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em sequenciador automático pelo método de Sanger (ABI 3500. Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) com os *primers forward 27* (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e *reverse 1492* (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (OSBORNE et al., 2005) com produto de 1400 pb.

Os cromatogramas obtidos no sequenciamento foram analisados com o auxílio da plataforma “*Electropherogram quality analysis*” (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). A qualidade das sequências foi analisada pelo programa *Phred*. Em seguida, os contigs foram gerados pelo programa CAP3 “*Sequence Assembly Program*” – (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) (HUANG; MADAN, 1999).

A sequência consensual gerada foi comparada com outras sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank), utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para busca de similaridades.

O alinhamento das sequências de nucleotídeos com as sequências previamente determinadas de cepas padrão foi realizado por *CLUSTAL W* (version 1.4) usando o software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). A árvore filogenética de distância foi calculada usando o modelo evolutivo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) e o algoritmo *Neighbor-joining*, com suporte de *bootstrap* para 1000 réplicas.

Análise estatística

Para análise estatística das contagens e elaboração do gráfico em Box Plot os resultados foram convertidos em log utilizando o software *Statistica* versão 7 (*StatSoft, OK, USA*).

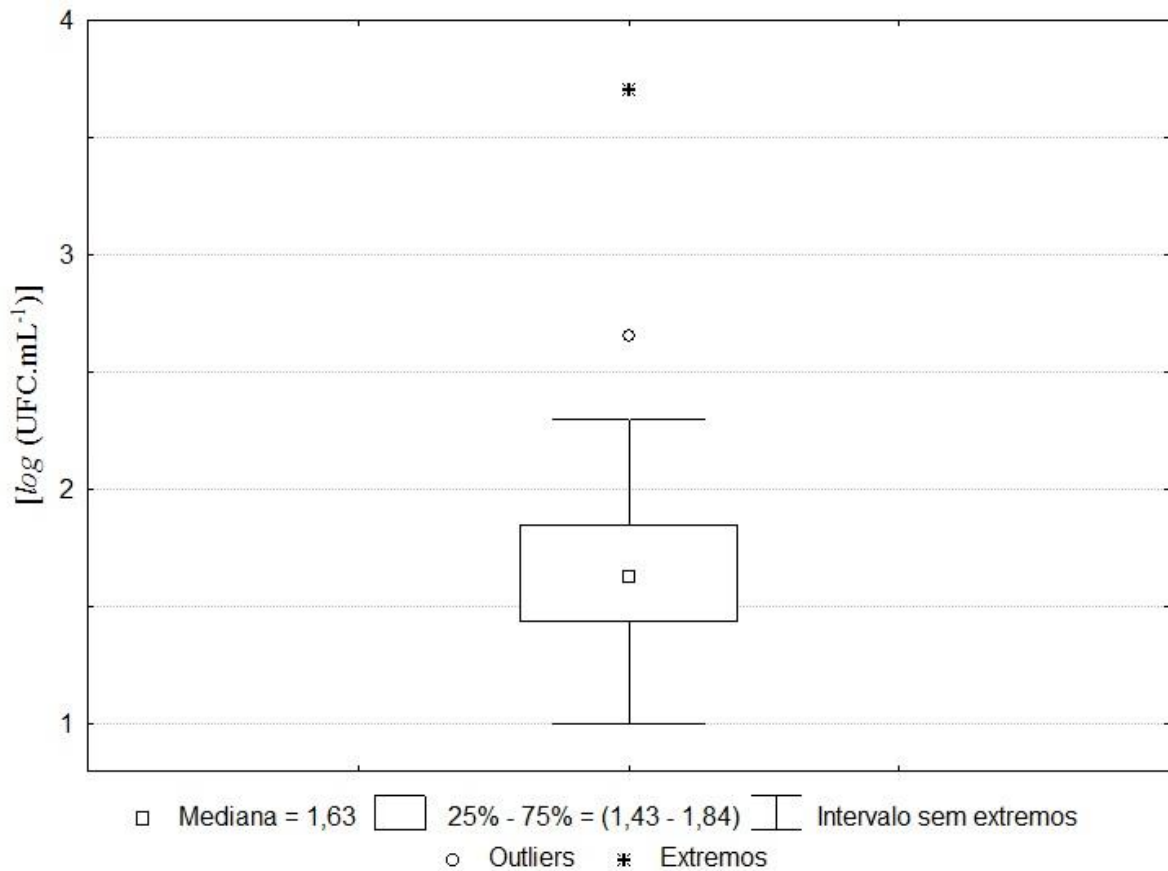
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem média de esporos aeróbios das amostras avaliadas foi de 1,75 log UFC.mL⁻¹, como demonstra a Tabela 1. A distribuição dos resultados pode ser observada na Figura 3. Houve boa homogeneidade da distribuição dos resultados das contagens a partir da mediana, desconsiderando *outliers* e valor extremo.

Tabela 1. Contagem (*log*) de esporos aeróbios de 20 amostras de leite cru refrigerado da região de Castro, Paraná, coletadas no período de novembro de 2013 a maio de 2014.

	<i>log</i> (UFC.mL ⁻¹)
Média	1,75
Mínimo	1,00
Máximo	3,70
Mediana	1,63
Desvio Padrão	± 0,59

Figura 3. Distribuição da contagem (*log*) de esporos aeróbios em 20 amostras de leite cru refrigerado coletadas na região de Castro, Paraná, no período de novembro de 2013 a maio de 2014.



Foram obtidos 137 isolados puros de bactérias aeróbias formadoras de esporos, dos quais 40 (29,2%) apresentaram atividade deteriorante do leite (Figuras 4 e 5, Apêndice A). Dessas, 31 (77,5%) foram proteolíticas e lipolíticas, 7 (17,5%) foram exclusivamente lipolíticas e 2 (5%) apenas proteolíticas (Apêndice A).

Figura 4. Halos de proteólise em ágar leite de cepas de bactérias formadoras de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado coletado na região de Castro, Paraná, entre novembro de 2013 a maio de 2014.

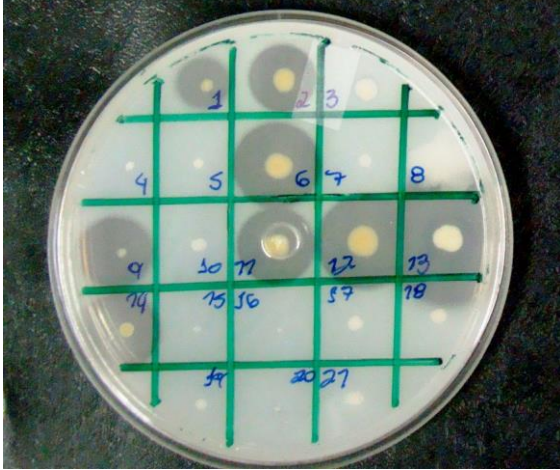
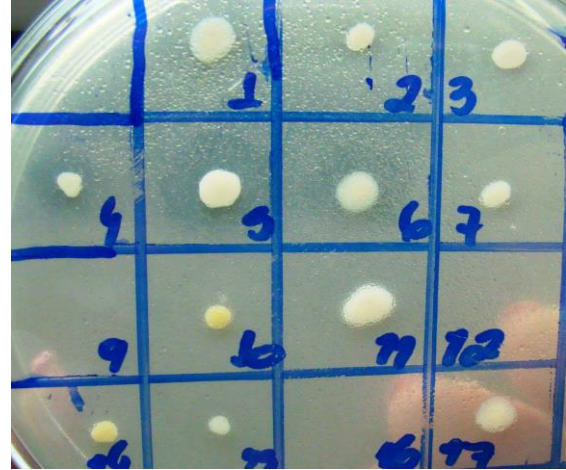
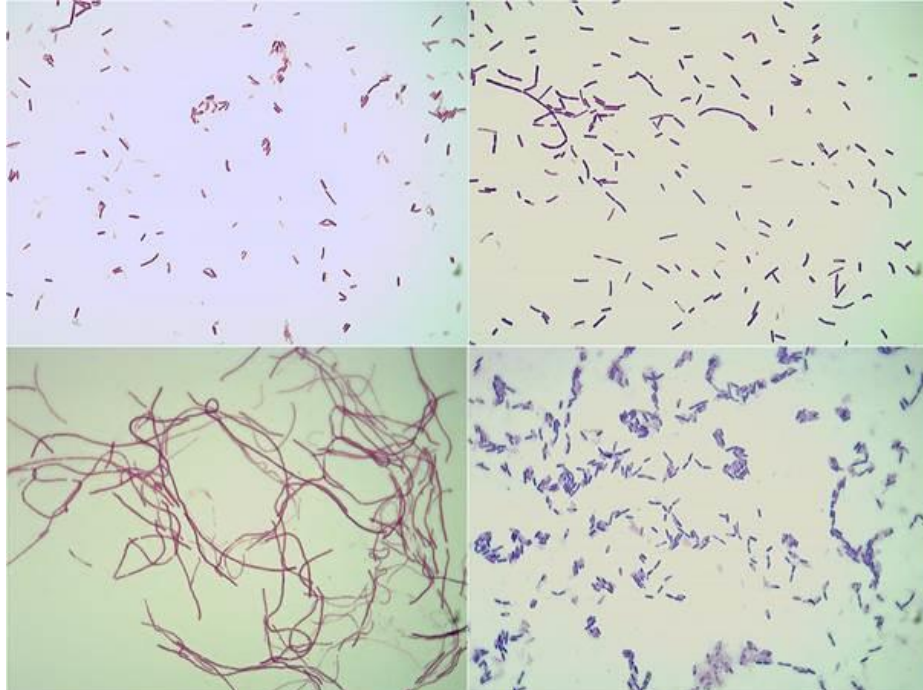


Figura 5. Halos de lipólise em ágar tributirina de cepas de bactérias formadoras de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado coletado na região de Castro, Paraná, entre novembro de 2013 a maio de 2014.



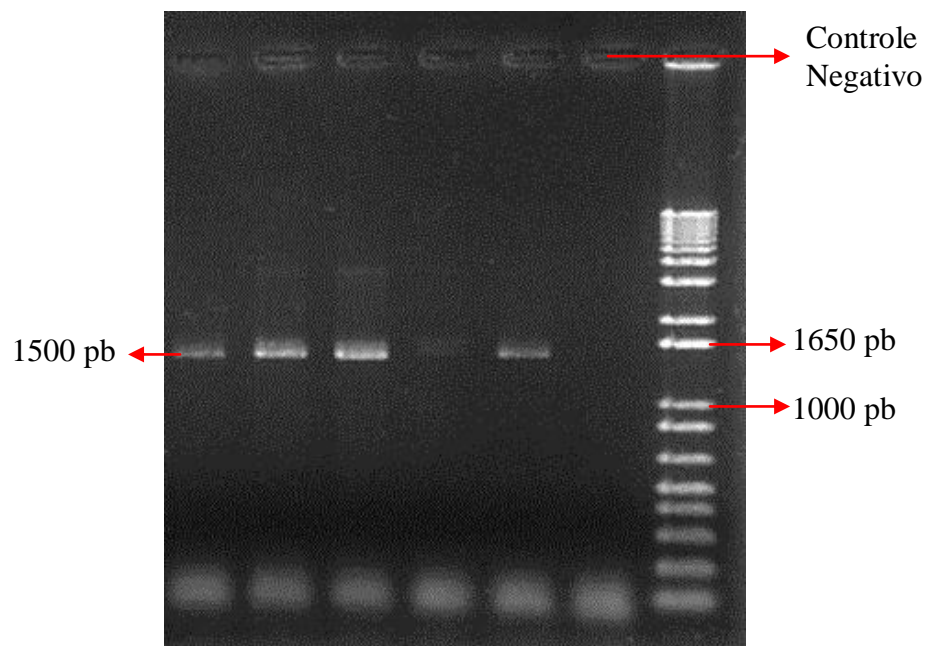
Na coloração de Gram, todas as 40 colônias apresentaram morfologia de bacilos Gram positivos, conforme Figura 6.

Figura 6. Morfologia de bactérias aeróbias formadoras de esporos isoladas de leite cru refrigerado na coloração de Gram. Aumento 1000X.



O fragmento esperado de 1500 pb do gene 16S rRNA foi obtido de todos os isolados deteriorantes de bactérias oriundas da germinação de esporos, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7. Resultado da reação de PCR de cinco cepas de bactérias formadoras de esporos isoladas de amostras de leite cru refrigerado da região de Castro, Paraná, coletadas no período de novembro de 2013 a maio de 2014.



O sequenciamento do 16S rRNA amplificado permitiu identificar a espécie de 25 dos 40 isolados através da comparação com outras sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank) utilizando o programa BLAST. As outras 15 cepas tiveram sua identificação em nível de gênero, conforme Tabela 2 e Apêndice A.

Tabela 2. Identificação por sequenciamento parcial e alinhamento de sequências do gene 16S rRNA de 40 cepas de bactérias deteriorantes formadoras de esporos, isoladas do leite cru refrigerado produzido na região central do estado do Paraná entre novembro de 2013 e maio de 2014 com cepas depositadas no GenBank.

Identificação	Identidade de nucleotídeos (%)*	(n)	(%)
<i>Bacillus licheniformis</i>	99 ou 100	22	55
<i>Bacillus sp.</i>	99 ou 100	11	27,5
<i>Paenibacillus sp.</i>	99 ou 100	3	7,5
<i>Bacillus pumilus</i>	100	2	5
<i>Bacillus circulans</i>	100	1	2,5
<i>Brevibacillus sp.</i>	100	1	2,5

* Percentual de identidade baseada no de alinhamento da sequência obtida pelo presente estudo com as depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando a ferramenta BLAST.

Foi observado que a maioria dos isolados de *B. licheniformis* apresentou atividade proteolítica e lipolítica e, diferentemente do resultado de estudos americanos que relatam atividade proteolítica de *Paenibacillus sp.* (HUCK et al., 2007; MARTIN et al., 2011), os isolados dos micro-organismos desse gênero obtidos no presente estudo apresentou somente atividade lipolítica, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Potencial deteriorante de cepas de bactérias oriundas da germinação de esporos aeróbios isolados do leite cru refrigerado da bacia leiteira da região de Castro, Paraná, coletadas no período de novembro de 2013 a maio de 2014.

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

Após o alinhamento das sequências gerou-se uma árvore filogenética (Figura 8) que demonstra diversidade nas cepas de *B. licheniformis* isoladas (números de acesso no GenBank KP713760 a KP713762), que foram compatíveis com diferentes cepas da mesma espécie depositadas. Nesse mesmo ramo, foi observada grande proximidade com outras espécies de bactérias formadoras de esporos isoladas do leite cru (KF879302.1, KF879293.1, KJ622304.1).

As sequências depositadas de *B. pumilus* (KP713763 e KP713764) ficaram agrupadas com *B. altitudinis* (KC414717), *B. aerophilus* (KC414715) e *B. safensis* (JN699023). Não foram encontrados estudos que descreveram essas cepas, que foram agrupadas no mesmo cluster de *B. pumilus*, como constituintes da microbiota esporulada aeróbia do leite cru, assim como *B. circulans* (KP713765) isolado pelo presente estudo.

Os outros micro-organismos dos gêneros *Paenibacillus* (KP713766) e *Brevibacillus* (KP713767) já possuem descrição de isolamento no leite cru e/ou pasteurizado na Eslovênia (SCHELDEMAN et al., 2005) e Estados Unidos (HUCK et al., 2007; MARTIN et al., 2011).

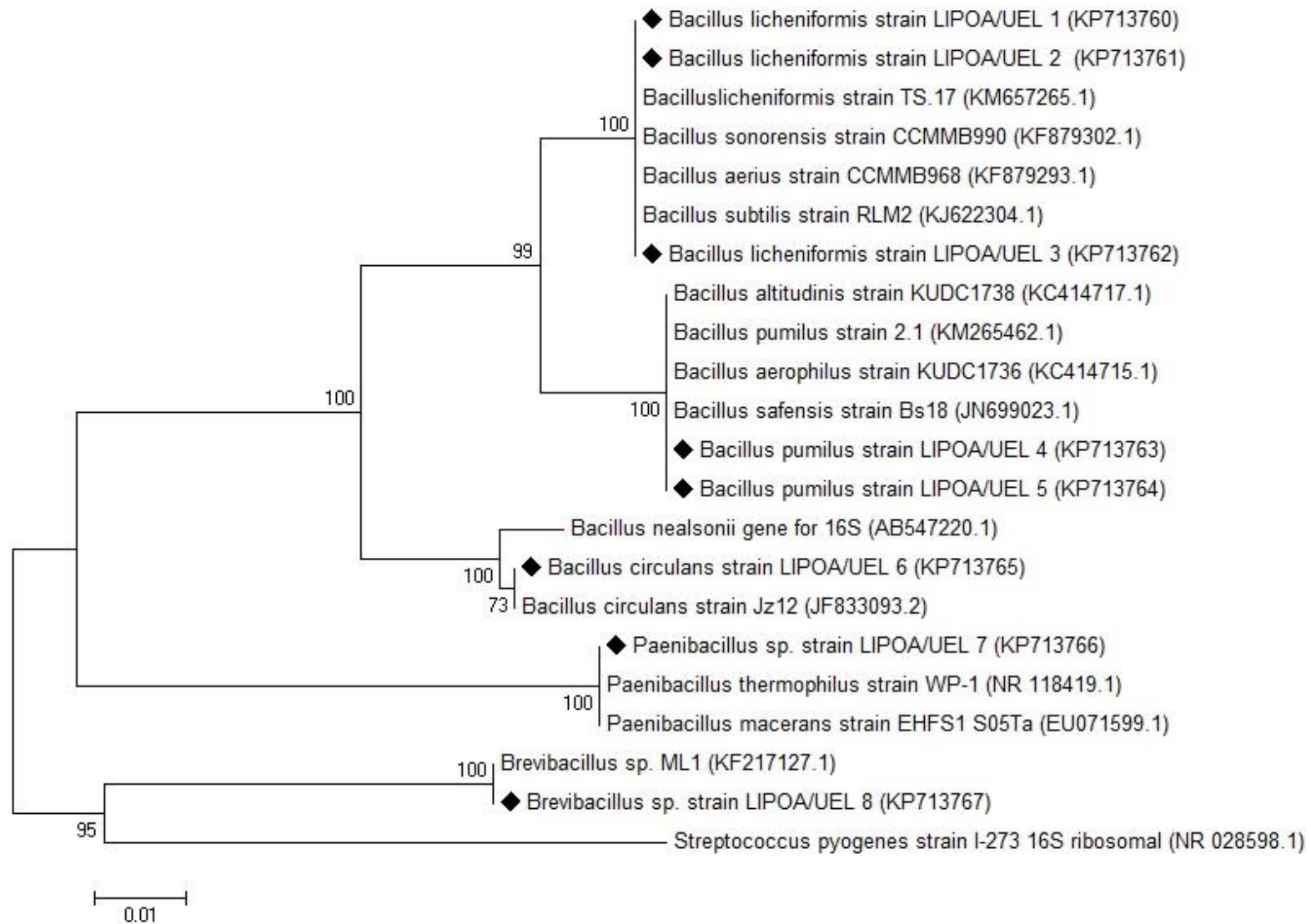


Figura 8. Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbor-joining baseado no alinhamento de 602 pb do 16S rRNA de bactérias formadoras de esporos. As amostras do presente estudo (cepas LIPOA/UEL, seguidas dos números de depósito no GenBank) estão agrupadas nas mesmas posições filogenéticas das cepas reconhecidas de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* (número de acesso da sequência no *GenBank*). A sequência do gene 16S rRNA de *Streptococcus pyogenes* (cepa I-273) foi utilizada como *outgroup*. A distância filogenética está indicada por 0,01 substituição de nucleotídeos.

As contagens de esporos aeróbios no leite cru da região estudada foi considerada baixa quando comparado com os resultados relatados por Huck et al. (2007) que encontraram médias de 4,69 e 4,03 log UFC/mL⁻¹ de bactérias formadoras de esporos no leite cru dos tanques de refrigeração de duas indústrias no estado de Nova Iorque, Estados Unidos. Nesse mesmo estado, Martin et al. (2011) acompanharam quatro indústrias de laticínios durante um ano e observaram contagens de esporos aeróbios no leite cru variando de 3,57 a 5,08 log UFC.mL⁻¹. Em concordância, Buehner et al. (2014) avaliaram as contagens de esporos aeróbios do leite cru no inverno (-9°C) e verão (30°C) no estado de Dakota do Sul, Estados Unidos, e verificaram diferença significativa nas respectivas contagens médias de 2,06 e 1,08 log UFC.mL⁻¹, contagens de esporos superiores no inverno possivelmente relacionada com o aumento da adversidade do ambiente pela queda de temperatura favorecendo o processo de esporulação das formas vegetativas desses micro-organismos. Scheldeman et al. (2005) encontraram média de 3,73 log UFC.mL⁻¹ de esporos aeróbios no leite cru refrigerado da Bélgica, relacionando a contaminação por bactérias esporuladas na silagem sem fermentação de 5,15 log UFC.mL⁻¹, em *swabs* de tanques de expansão de 2,71 log UFC.mL⁻¹ e do concentrado proteico 5,91 log UFC.mL⁻¹.

O *Bacillus licheniformis* é a espécie de bactéria esporulada aeróbia mais frequentemente isolada do leite cru em diversos países como Bélgica (SCHELDEMAN et al., 2005; COOREVITS et al., 2008), Uruguai (REGINENSI et al., 2011), China (YUAN et al., 2012) e Estados Unidos (BUEHNER et al., 2014), e seus esporos podem ser disseminados pelo ar (TORTORA et al., 2013). Esses micro-organismos têm a capacidade de multiplicar-se em temperaturas de 15 a 55°C e em até 7% de concentração de cloreto de sódio, produzem hidrolases de caseína, apresentam endoesporo na região central, multiplicam-se em pH entre 5,5 a 8,5 e reduzem nitrato em nitrito (BURGESS et al., 2010). Apresentam ainda potencial biotecnológico para produção de proteases industriais por processos fermentativos, como as proteases metal e serina, cujo pH ótimo é próximo ao neutro e alcalino, respectivamente (PALLADINO, 2008).

A produção de proteases serinas por *Bacillus pumilus* foi estudada por Aoyama et al. (2000) no processo de coagulação de leite de soja. Esse micro-organismo foi isolado do leite na Bélgica (COOREVITS et al., 2008), Uruguai (REGINENSI et al., 2011) e Estados Unidos (BUEHNER et al., 2014) e foi caracterizado por Burgess et al. (2010) como produtor de proteases que hidrolisam a caseína, com esporo de posição central e multiplicação em temperaturas de 5 a 55°C em até 7% de cloreto de sódio.

A produção de lactase por *Bacillus circulans* é conhecida e utilizada em processos biotecnológicos (BULTEMA et al., 2014), assim como a ciclodextrina glicosiltransferase, que catalisa a conversão do amido em oligossacarídeos cíclicos ou lineares, produtos industriais importantes para a complexação de substâncias não polares (COSTA et al., 2015). No entanto, não havia até o momento descrição sobre sua presença na microbiota esporulada do leite cru e tão pouco sobre a atividade lipolítica dessa espécie.

Os micro-organismos do gênero *Paenibacillus* são frequentemente relatados como componentes da microbiota esporulada do leite cru nos Estados Unidos (SCHELDEMAN et al., 2004; HUCK et al., 2007; RANIERI et al., 2012). Ainda não haviam sido encontrados em estudos realizados no Brasil.

A origem da contaminação do leite por *Paenibacillus sp.* está relacionada, provavelmente, com os alimentos dos animais, uma das fontes de contaminação por *Bacillus sp.* (GIFFEL et al., 2002). O processo de germinação dos esporos de *Paenibacillus sp.* no leite pasteurizado ocorre durante a vida de prateleira, iniciando o processo de deterioração causando alterações sensoriais (SCHELDEMAN et al., 2005), promovendo proteólise e lipólise. No entanto, no presente estudo, diferentemente a atividade lipolítica foi verificada.

Huck et al. (2007) verificaram que o leite cru dos Estados Unidos, experimentalmente pasteurizado e estocado por 14 dias a 6°C, apresentou microbiota composta predominantemente por *Paenibacillus sp.* (83 de 88 isolados), atribuindo à germinação dos esporos desses micro-organismos durante a vida útil sob refrigeração, a consequente deterioração do leite pasteurizado. Martin et al. (2011) também verificaram germinação de esporos de *Paenibacillus sp.* a partir de 14 dias de vida útil do leite pasteurizado, sendo que após 21 dias essa microbiota era composta basicamente por *Bacillus* e *Paenibacillus*.

Vissers et al. (2007) estimaram que numa contaminação de 1.000 UFC/mL de micro-organismos esporulados no leite, 33% têm origem no solo. Outros trabalhos relatam que o leite pode ser contaminado por micro-organismos esporulados a partir dos alimentos dos animais, água, fezes, tetos e equipamento de ordenha (HULL et al., 1992; CHRISTIANSSON et al., 1999; TORP et al., 2001; GIFFEL et al., 2002). No grupo dos alimentos, a silagem de milho pode apresentar contagens de 11,81 a 6,30 log UFC/g de bactérias esporuladas dependendo da época do ano (BUEHNER et al., 2014), sendo relatada como uma importante fonte de contaminação para o leite, além das condições de produção e armazenamento.

Borreani et al. (2013) avaliando essas condições de armazenamento da silagem de milho, verificou que as contagens de esporos aeróbios podem variar de 2,65 a 9,30 log UFC/g de silagem entre o primeiro e o 14º dia de exposição ao ar. Esses mesmos autores indicam que a população de *Paenibacillus sp.* nessa silagem representa 58,2% e 88,9% dessas contagens, respectivamente.

Dessa forma, para redução desses micro-organismos no leite faz-se necessária a implantação de medidas profiláticas de higienização desses pontos de contaminação, evitar que poeira e alimentos dos animais entrem em contato com o leite, evitando-os na ordenha e mantendo todos os circuitos de obtenção e armazenamento devidamente vedados.

CONCLUSÃO

As contagens de esporos aeróbios nas amostras de leite estudadas foram relativamente baixas, porém quase 30% desses micro-organismos apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica.

A microbiota esporulada proteolítica é composta, predominantemente, por *B. licheniformis*, seguido por *B. pumilus* e por *Bacillus sp.*, e a lipolítica por *B. licheniformis*, seguido por *B. pumilus*, *B. circulans*, *Bacillus sp.* e *Paenibacillus sp.*

O *B. licheniformis* predominam entre os esporulados deteriorantes do leite.

O presente estudo descreveu pela primeira vez a detecção de *Paenibacillus* e *B. circulans* fazendo parte da microbiota esporulada do leite no Brasil.

Prevenir a contaminação por esporos diminui a deterioração e aumenta a vida útil do leite.

REFERÊNCIAS

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.

AOYAMA, M., YASUDA, M., NAKACHI, K., KOBAMOTO, N., OKU, H., KATO, F. Soybean-milk-coagulating activity of *Bacillus pumilus* derives from a serine proteinase. **Applied Microbiology and Biotechnology** 53, 390-395, 2000.

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., 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.

BORREANI, G., DOLCI, P., TABACCO, E., COCOLIN, L. Aerobic deterioration stimulates outgrowth of spore-forming *Paenibacillus* in corn silage stored under oxygen-barrier or polyethylene films. **Journal of Dairy Science** 96, 5206-5216, 2013.

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

BULTEMA, J. B., KUIPERS, B. J. H., DIJKHUIZEN, L. Biochemical characterization of mutants in the active site residues of the β -galactosidase enzyme of *Bacillus circulans* ATCC 31382. **FEBS Open Bio** 4, 1015-1020, 2014.

BURGESS, S. A., LINDSAY, D., FLINT, S. H. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **International Journal of Food Microbiology** 144, 215-225, 2010.

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.

CHENG, H. R., JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters** 28, 55-59, 2006.

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

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

COSTA, H., GASTÓN, J. R., LARA, J., MARTINEZ, C. O., MORIWAKI, C., MATIOLI, G., FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin glycosyltransferase production by free cells of *Bacillus circulans* DF 9R in batch fermentation and by immobilized cells in a semi-continuous process. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 38, 39-47, 2015.

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

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, 2004.

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

GLEESON, D., CONNELL, A., JORDAN, K. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. **Irish Journal of Agricultural and Food Research** 52, 217-227, 2013.

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.

HUANG, X., MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research** 9, 868-877, 1999.

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

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

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology** (6th ed.) New York: Chapman and Hall, pp. 701, 2000.

JUNQUEIRA, J., CARNEIRO, L. C. **Biologia Celular e Molecular** (9^a ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 302, 2012.

MARTIN, N. H., RANIERI, M. L., MURPHY, S. S., RALYEA, R. D., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf-life performance of commercially pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science** 94, 1211-1222, 2011.

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.

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.

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.

PALLADINO, F. **Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado a base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.**

Dissertação de mestrado em Engenharia Industrial, USP, São Paulo-SP, pp. 75, 2008.

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

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

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

RIBEIRO JÚNIOR, J. C., SILVA, L. C. C., TAMANINI, R., BELOTI, V. Qualidade do leite produzido por pequenos e grandes produtores. **Semina: Ciências Agrárias** 36, 07-20, 2015.

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

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

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

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution** 10, 512-526, 1993.

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.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiology: an introduction** (11th), Yorkshire: Pearson, 975 pp., 2013.

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

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

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

5 ARTIGO B

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TERMODÚRICOS PROTEOLÍTICOS DO LEITE CRU REFRIGERADO

RESUMO

Os micro-organismos termodúricos são capazes de resistir à pasteurização do leite e irão compor a microbiota do leite pasteurizado, estando diretamente relacionados à sua vida útil. A importância de bactérias termodúricas proteolíticas na deterioração do leite é bastante estudada, mas não há relatos sobre a atividade proteolítica de fungos no leite. O objetivo do presente trabalho foi identificar os bolores e leveduras proteolíticas termodúricos no leite cru refrigerado. Foram avaliadas 20 amostras de leite cru refrigerado, tratados termicamente por 30 min à $62 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e semeados em quadruplicata, sendo uma duplicata incubada a $37^\circ\text{C}/48\text{h}$ e outra a $7^\circ\text{C}/10$ dias. Os isolados fúngicos foram repicados em ágar leite para verificação da atividade proteolítica. Os bolores e leveduras que apresentaram potencial proteolítico foram analisados morfológicamente através de microscopia óptica e, posteriormente, analisados molecularmente para a identificação das espécies. Foram observados crescimentos fúngicos em 8 (40%) das 20 amostras avaliadas. Foi isolado 1 fungo mesófilico e outros 10 psicrotróficos, sendo que todos os isolados eram proteolíticos. Por meio da análise da região ITS1-5,8S-ITS2 o isolado mesofílico foi identificado como *Fusarium chlamydosporum* (9,09%) e os psicrotróficos como *Cladosporium cladosporoides* (54,54%), *Curvularia geniculatus* (9,09%) e as outras 3 cepas foram identificadas como *Geotrichum candidum* (27,27%). A constatação do potencial deteriorante de fungos presentes no leite cru e remanescentes no leite pasteurizado é de extrema importância e outros estudos devem ser conduzidos para avaliar a extensão de sua resistência térmica, e sua interferência na vida útil do produto pasteurizado e também UHT, bem como seu potencial micotoxigênico.

Palavras-chave: bolor, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, levedura

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMODURIC PROTEOLYTIC FUNGI FROM REFRIGERATED RAW MILK

ABSTRACT

Thermoduric microorganisms can withstand high temperatures during pasteurization of milk. Therefore, microbiota of pasteurized milk consists of thermoduric microbes and directly influences the shelf-life of the milk. The role of proteolytic thermoduric bacteria in milk spoilage has been widely studied, but there are no current data on the proteolytic activity of fungi in milk. The aim of this study was to identify thermoduric, proteolytic fungi and yeasts in refrigerated raw milk. Twenty samples of refrigerated raw milk, previously heat-treated for 30 min at $62 \pm 0.5^\circ\text{C}$, were streaked on standard plate-count agar in quadruplicate; two were incubated at 37°C for 48 h and the others at 7°C for 10 days. Fungal isolates were streaked on milk agar to assess proteolytic activity. Fungi and yeasts with proteolytic potential were initially analyzed morphologically by light microscopy and then by molecular techniques to identify the species. Fungal growth was observed in 8 (40%) of the 20 samples analyzed. All isolates were proteolytic and included 1 mesophilic fungus and 10 psychrotrophic fungi. Analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region revealed that the mesophilic isolate belongs to *Fusarium chlamydosporum* species complex (9.09%), the psychrotrophs to *Cladosporium cladosporioides* (54.54%) and *Curvularia geniculatus* (9.09%), whereas the remaining 3 strains were identified as *Geotrichum candidum* (27.27%). Considering the spoilage potential of fungi present in raw milk and their survival in pasteurized milk, it is extremely important to carry out further studies to assess the extent of heat resistance, their impact on the shelf-life of pasteurized and ultra-high temperature (UHT) products, and their mycotoxigenic potential.

Key words: *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, mould, yeast

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos termodúricos são aqueles que resistem a curtos períodos de exposição a altas temperaturas, como ocorre no processo de pasteurização do leite (JAY, 2000). No leite, esses micro-organismos, juntamente com a contaminação adquirida após o processamento térmico, irão compor a microbiota que está diretamente relacionada com a vida útil desse produto (RANIERI et al., 2012).

Alguns termodúricos ainda apresentam capacidade de crescerem e se multiplicarem em temperaturas de refrigeração do leite, e frequentemente produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que deterioram o produto. Esses micro-organismos pertencem ao grupo dos psicotróficos (JAY, 2000). A degradação de proteínas e a gordura do leite também influencia a vida útil dos derivados, assim como suas características sensoriais (CHEN et al., 2003). Os micro-organismos psicotróficos não termodúricos, morrem na pasteurização e tratamento UHT, embora produzam enzimas deteriorantes no leite cru que são resistentes ao tratamento térmico. No entanto, os psicotróficos termodúricos sobrevivem ao tratamento térmico e continuam crescendo no produto e produzindo enzimas, acelerando a deterioração.

No grupo dos micro-organismos termodúricos, além de bactérias, podem ser isolados fungos que também podem crescer em temperaturas de refrigeração e produzir proteases. Alguns desses, no entanto, podem apresentar características tecnológicas desejáveis, uma vez que conferem aspectos sensoriais característicos a alguns derivados (POTTIER et al., 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a presença de fungos no leite cru, sua resistência térmica, adaptabilidade às temperaturas de refrigeração e seu potencial deteriorante.

A diversidade fúngica é comumente avaliada por meio de métodos de cultivo e sua identificação é baseada em características fenotípicas das colônias. São métodos demorados e podem não ser definitivos pela ausência de características que permitam sua identificação morfológica. O objetivo do presente trabalho foi identificar, através do sequenciamento parcial da região ITS do rRNA, os fungos termodúricos mesófilos e psicotróficos produtores de proteases isolados de leite cru refrigerado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 20 amostras de leite cru refrigerado produzido na bacia leiteira da região de Castro, Paraná, Brasil, no período de novembro de 2013 a maio de 2014.

As amostras foram coletadas nos tanques de refrigeração de leite nas propriedades com o auxílio de uma caneca para coleta de leite previamente esterilizada. As amostras foram transportadas em frascos estéreis com volume de 500 mL e imediatamente encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, sendo analisadas em menos de 4 horas após a coleta.

O tratamento das amostras para análise de micro-organismos termofílicos foi realizado conforme descrito por Frank e Youssef (2004). Após a homogeneização da amostra no próprio frasco de transporte, 5 mL foram adicionados a um tubo de ensaio estéril com tampa de rosca para o tratamento térmico ($62,8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) em banho-maria por 30 minutos, que foram contados a partir do momento em que um tubo controle com um termômetro atingiu a temperatura preconizada. Imediatamente após o tratamento térmico, os tubos foram imersos em banho de gelo até atingirem a temperatura de 10°C .

As amostras de leite pasteurizado foram então semeadas por superfície em ágar padrão para contagem (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) em quadruplicata. Uma duplicata de cada diluição foi incubada a 37°C por 48h para contagem de micro-organismos mesófilos e a outra duplicata de cada diluição foi incubada a 7°C por 10 dias para a contagem de micro-organismos psicotróficos.

Os isolados fúngicos foram repicados em placa de petri com ágar leite (Acumedia, Baltimore, USA) suplementado (9:1) com uma solução estéril de leite em pó desnatado reconstituído (10%) para verificar a atividade proteolítica, e incubados à 32°C por 5 dias (FRANK; YOUSSEF, 2004).

Os isolados fúngicos obtidos das amostras de leite foram inicialmente avaliados morfológicamente (macro e micro). Estes foram inoculados em três pontos em placas contendo o meio *Czapek Yeast Autolysate Agar* (CYA) (PITT, 1979) seguidos de incubação a 25°C por 7 dias. Após incubação, procedeu-se as observações das características macromorfológicas das cepas. Para as observações micromorfológicas, as lâminas foram preparadas com etanol 70% e ácido láctico.

As análises moleculares foram realizadas após o cultivo dos isolados fúngicos em meio de cultura completo líquido (PONTECORVO et al., 1953), com incubação a 25°C durante aproximadamente 72 h, seguido da extração do DNA genômico utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) segundo Azevedo et al. (2000). As amostras fúngicas foram submetidas à amplificação e sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA, visando a identificação das espécies. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se os de *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') descrito por White et al. (1990). A reação foi realizada utilizando-se o aparelho PTC-100 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA) e temperatura de anelamento a 58°C.

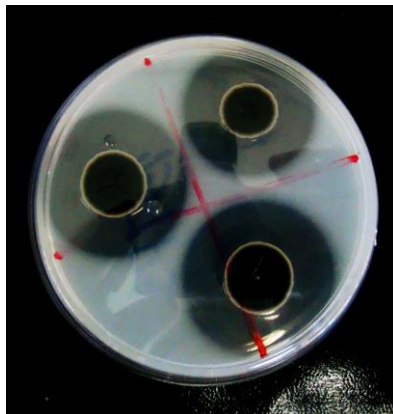
Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin (Promega, Madison, WI, USA) e submetidos ao sequenciamento direto em ambas as direções usando o Kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) com as seguintes condições: desnaturação inicial 95°C a 1 min, 30 ciclos de amplificação compostos por desnaturação 95°C a 20 seg, anelamento a 50°C a 15 seg e extensão a 60°C a 1 min e 30 seg seguido de extensão final a 60°C a 1 min e 30 seg. Um volume de *HiDiformamide* foi adicionado ao produto de sequenciamento, e em seguida foi sequenciado utilizando-se o aparelho ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

A análise da qualidade das sequências obtidas foi visualizada através do eletroferograma com o auxílio do software *BioEdit* (Ibis Bio-sciences, Carlsbad, CA, USA), e posteriormente as sequências foram comparadas com as sequências já depositadas no MycoBank (www.mycobank.org). Quando necessário, as sequências foram alinhadas utilizando-se o Clustal W incluso no software *BioEdit*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 20 amostras de leite estudadas, 8 (40%) apresentaram crescimento fúngico. Onze colônias de fungos foram obtidas, sendo um (9,1%) mesófilo e dez (90,9%) psicrotróficos. Todos os isolados foram proteolíticos, pela verificação de halos de proteólise ao redor do crescimento nas placas de ágar leite suplementado (Figura 9).

Figura 9. Halo de proteólise em ágar leite suplementado semeado em três pontos com *Cladosporium cladosporoides*.



Na identificação micro morfológica observou-se que o isolado mesófilo pertencia ao gênero *Fusarium* e os psicrotróficos aos gêneros *Cladosporium* (6 isolados) e *Curvularia* (1 isolado). Outros 3 isolados psicrotróficos não foram identificáveis morfológicamente, devido à ausência de conídios e conidióforos característicos (Figura 10 a 13).

Figura 10. Característica macroscópica de *Cladosporium* isolado de leite cru refrigerado em meio Czapek Yeast Autolysate Agar.



Figura 11. Característica macroscópica de *Curvularia* isolado de leite cru refrigerado em meio Czapek Yeast Autolysate Agar.

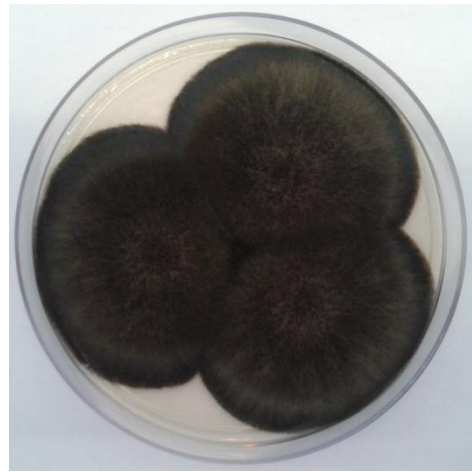
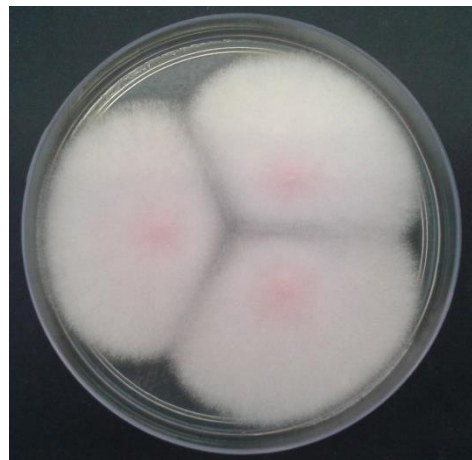


Figura 12. Característica macroscópica de *Geotrichum* isolado de leite cru refrigerado em meio Czapek Yeast Autolysate Agar.

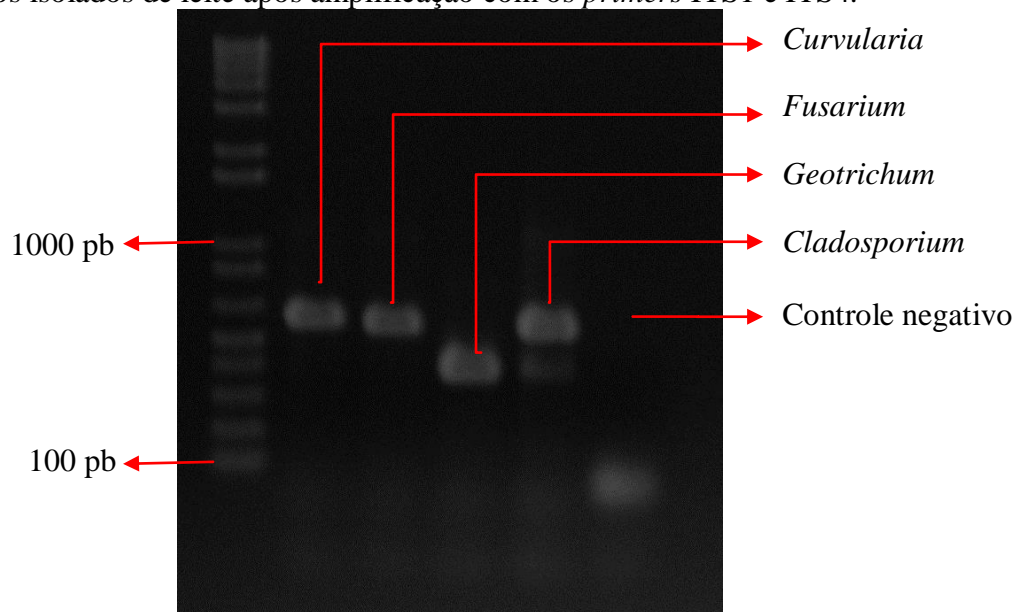


Figura 13. Característica macroscópica de *Fusarium* isolado de leite cru refrigerado em meio Czapek Yeast Autolysate Agar.



O sequenciamento do rRNA confirmou a identificação morfológica para gêneros (Figura 14) e permitiu a identificação até o nível de espécie. O isolado mesófilo foi identificado como *Fusarium chlamydosporum* (9,09%) e os psicrotróficos foram identificados confirmados como *Cladosporium cladosporoides* (54,54%) e *Curvularia geniculatus* (9,09%). Os três isolados em que não foi possível a identificação morfológica foram identificados molecularmente como *Geotrichum candidum* (27,27%).

Figura 14. Eletroforese das amostras de rRNA de fungos termodúricos mesófilos e psicrotróficos isolados de leite após amplificação com os *primers* ITS1 e ITS4.



A resistência desses micro-organismos proteolíticos ao tratamento térmico resulta na sua sobrevivência no leite pasteurizado. Como são produtores de enzimas deteriorantes, poderão diminuir a vida útil do leite fluido, bem como produzir micotoxinas, dependendo da cepa, gênero e espécie, e ainda causar doenças em pessoas imunocomprometidas (LACAZ et al., 2002).

Ruz Peres et al. (2010) compararam a resistência de fungos filamentosos e leveduras à pasteurização rápida (72°C / 20 seg), lenta (65°C / 30 min) e a fervura (98°C) do leite, e verificaram que o processo de pasteurização rápida foi o tratamento térmico no qual houve o maior índice de resistência (72,18%) por parte dos isolados de leveduras e fungos filamentosos testados, seguido pela fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%). Nesse mesmo estudo, verificaram que 77,14% dos 35 isolados de *Geotrichum* foram resistentes à pasteurização rápida e nenhuma à pasteurização lenta do leite.

Torkar e Vengust (2008) isolaram 68 estirpes de fungos de leite cru na Eslovênia, nas quais os gêneros *Geotrichum* (51,5%), *Aspergillus* (33,8%), *Mucor* (5,9%), *Fusarium* (2,9%) e *Penicillium* (2,9%) foram encontrados, enquanto Jodral et al. (1993) relataram que os gêneros mais frequentemente isolados de leite cru na Espanha foram *Geotrichum* (76,5%), *Fusarium* (45,3%) e *Aspergillus* (31,2%).

Os fungos do gênero *Fusarium* têm importância econômica em culturas de grãos e cereais, uma vez que são responsáveis por perdas significativas na produtividade e qualidade principalmente do milho (HUBBARD et al., 1957). Além disso, são produtores de toxinas, as fumonisinas, uma classe de micotoxinas produzida por várias espécies de *Fusarium*, representando uma ameaça potencial para a saúde humana e animal (Caldas et al., 1998).

A fumonisina B1 pode alterar a morfologia celular, as interações célula-célula, o comportamento das proteínas da superfície celular, a atividade da proteína-quinase, e o crescimento e a viabilidade celular (MERRILL et al., 1996). Pode ainda induzir a apoptose em células de animais e de plantas (WANG et al., 1996). No organismo, a fumonisina B1 induz uma série de enfermidades nos animais, incluindo neuro intoxicação, intoxicação renal, hepatotoxicose e neoplasias, bem como a morte de células (MERRILL et al., 1996).

O *Cladosporium cladosporoides* é relatado como produtor de invertase, uma enzima importante em processos biotecnológicos de transformação de sacarose em frutose (UMA et al., 2010), enquanto os fungos do gênero *Curvularia* são relacionados à produção de serina proteases responsáveis por causar alergias e infecções respiratórias pela inalação do fungo (ALEX et al., 2013).

Geotrichum candidum é uma levedura cuja presença é desejável na superfície de alguns queijos (ELISKASES-LECHNER et al., 1997). O *G. candidum* é utilizado como fermento na indústria de laticínios e coloniza quase todos os queijos curados por superfície durante os primeiros estágios de maturação (BERGER et al., 1999) conferindo textura, coesão e espessura da casca (BOUTROU; GUÉGUEN, 2005) além de compostos aromáticos característicos de alguns queijos (JOLLIVET et al., 1994).

Essas características nos queijos ocorrem, principalmente, devido à produção de proteases extracelulares pelas cepas de *G. candidum* (BOUTROU et al., 2002). Sua presença no leite cru destinado à pasteurização e comercialização de leite fluido, no entanto, pode alterar a vida útil do leite envazado, uma vez que esses micro-organismos são termodúricos, psicrotróficos e proteolíticos.

CONCLUSÃO

O leite cru pode apresentar fungos termodúricos mesófilos e psicrotróficos com atividade proteolítica. O fungo mesofílico foi identificado como *Fusarium chlamydosporum* enquanto que as espécies psicrotróficas predominantes foram *Cladosporium cladosporoides*, *Curvularia geniculatus* e *Geotrichum candidum*. A presença de fungos termodúricos mesófilos e psicrotróficos proteolíticos no leite cru pode resultar em redução da vida útil do leite pasteurizado, bem como em risco à saúde pela presença de cepas patogênicas e produtoras de micotoxinas.

REFERÊNCIAS

- ALEX, D., LI, D., CALDERONE, R., PETERS, S.M. Identification of *Curvularia lunata* by polymerase chain reaction in a case of fungal endophthalmitis. **Medical Mycology Case Reports** 2, 137–140, 2013.
- AZEVEDO, A.C.S., FURLANETO, M.C., SOSA-GÓMEZ, D.R., FUNGARO, M.H.P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agricola** 57, 729–732, 2000.
- BERGER, C., KHAN, J.A., MOLIMARD, P., MARTIN, N., SPINLER, H.E. Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. **Applied and Environmental Microbiology** 65, 5510–5514, 1999.
- BOUTROU, R., FAMELART, M.H., GAUCHERON, F., LE GRAET, Y., GASSI, J.Y., PIOT, M., LEONIL, J. Structure development in a soft cheese curd model during manufacture in relation to its biochemical characteristics. **The Journal of Dairy Research** 69, 605–618, 2002.
- BOUTROU, R., GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology** 102, 1–20, 2005.

CALDAS, E.D., SADILKOVA, K., WARD, B.L., JONES, A.D., WINTER, C.K., GILCHRIST, D.G. Biosynthetic studies of fumonisin B₁ and AAL toxins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46, 4734–4743, 1998.

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.

ELISKASES-LECHNER, F., KOSSLER, A., GINZINGER, W. The incidence and characterization of *Geotrichum* sp. in cheese. **Deutsche Molkerei-Zeitung, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft**, 118, 56–61, 1997.

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, 2004.

HUBBARD, J.E., EARLE, F.R., SENTI, F.R. Moisture relations in wheat and corn. **Cereal Chemistry** 34, 422–433, 1957.

JAY, J. M., **Modern food microbiology** (6th ed.) New York: Chapman and Hall, pp. 701, 2000.

JODRAL, M., LINAN, E., ACOSTA, I., GALLEGRO, C., ROJAS, F., BENTABOL, A. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **International Journal of Food Microbiology** 18, 171–174, 1993.

JOLLIVET, N., CHATAUD, J., VAYSSIER, Y., BENSOUSSAN, M., BELIN, J. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link, **Journal of Dairy Research** 61, 241–248, 1994.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M., TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de micologia médica**, São Paulo: Sarvier, 2002.

- MERRILL, A.H. JR., LIOTTA, D.C., RILEY, R.T. Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. **Trends in Cell Biology** 6, 218–223, 1996.
- PITT J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **Academic Press Inc.**, London, 1979.
- PONTECORVO, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., MACDONALD, K.D., BUFTON, A.W. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics** 5, 141–148, 1953.
- POTTIER, I., GENTE, S., VERNOUX, J.P., GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International Journal of Food Microbiology** 126, 327–332, 2008.
- RANIERI, M.L., IVY, R.A., MITCHELL, W.R., CALL, E., MASIELLO, S.N., WIEDMANN, M., BOOR, K.J. Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. **Applied and Environmental Microbiology** 78, 5855–63, 2012.
- RUZ-PERES, M., BENITES, N.R., YOKOYA, E., MELVILLE, P.A. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Veterinária e Zootecnia** 17, 62–70, 2010.
- TORKAR, K.G., VENGUŠT, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control** 19, 570–577, 2008.
- UMA, C., GOMATHI, D., MUTHULAKSHMI, C., GOPALAKRISHNAN, V.K. Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. **Advances in Biological Research** 4, 31–36, 2010.
- WANG, W., JONES, C., CIACCI-ZANNELLA, J., HOLT, T., GILCHRIST, D.G., DICKMAN, M.B. Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93, 3461–3465, 1996.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, Academic Press, San Diego, pp. 315–322, 1990.

6 CONCLUSÃO

- As contagens de bactérias formadoras de esporos encontradas são menores que as encontradas em países como Estados Unidos e Bélgica, provavelmente pelas amostras serem oriundas de uma região que produz leite com alta qualidade.

- Cerca de 1/3 dos esporos encontrados no leite originou bactérias com potencial deteriorante, proteolíticas e/ou lipolíticas.

- Os micro-organismos que germinaram a partir de esporos encontrados nas amostras avaliadas pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Brevibacillus*.

- *B. licheniformis* predominam entre as bactérias que germinaram dos esporos presentes nas amostras de leite estudadas.

- Alguns micro-organismos como *Paenibacillus sp.* e *Bacillus circulans* são importantes deteriorantes e estão sendo descritos pela primeira vez no leite cru refrigerado produzido no Brasil.

- As espécies de fungos termodúricos psicrotróficos isolados nas amostras avaliadas foram: *Fusarium chlamydosporum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Curvularia geniculatus* e *Geotrichum candidum*

- A presença de fungos termodúricos no leite está sendo descrita no Brasil pela primeira vez como agente deteriorante, além de serem potenciais produtores de micotoxinas (gênero *Fusarium*).

- O controle da contaminação do leite cru por esporos pode melhorar a qualidade do leite pasteurizado e UHT e desta forma, aumentar sua vida útil.

APÊNDICE A

Caracterização individual de colônias de bactérias proteolíticas e/ou lipolíticas formadoras de esporos isoladas do leite

Esporos Aeróbios Gram Positivos																		
Amostra	N.	Prot.	Lipo.	Morfologia	Cat.	Coag.	Oxi.	Ágar Sangue					PCA				Identificação	ID
								(mm)	Cor	Borda	Hem.	Bri./Op.	(mm)	Cor	Borda	Muco		
2	11	x	x	bacilo	p	n	n	2	bca	i	não	brilho	2	bca	i	sim	<i>Bacillus sp.</i>	99
5	1	x	x	bacilo	p	n	n	3	vrđ	i	sim	opaco	3	bca	i	não	<i>Bacillus pumilus</i>	100
	6	x		bacilo	p	n	n	1	am	r	não	brilho	sc				<i>Bacillus sp.</i>	100
7	3		x	bacilo	p	n	n	3	am	i	não	brilho	5	am	i	não	<i>Bacillus sp.</i>	99
8	1	x	x	bacilo	p	n	n	2	bca	i	não	brilho	4	bca	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	2	x	x	bacilo	p	n	n	2	bca	i	não	brilho	4	bca	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
9	9	x	x	bacilo	p	n	n	5	am	i	não	brilho	5	am	i	não	<i>Bacillus sp.</i>	99
	13	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	sim	opaco	6	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
	15	x	x	bacilo	p	n	n	4	bca	i	não	brilho	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
10	1	x	x	bacilo	p	n	n	3	bca	i	não	brilho	5	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	2	x	x	bacilo	p	n	n	3	bca	i	não	opaco	5	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	3	x		bacilo	p	n	n	3	cnz	i	sim	opaco	7	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	4	x	x	bacilo	p	n	n	3	cnz	i	não	opaco	7	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	6	x	x	bacilo	p	n	n	6	cnz	i	sim	opaco	6	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
11	6	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	sim	opaco	5	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
12	3	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	sim	opaco	4	am	i	não	<i>Bacillus pumilus</i>	100
13	2	x	x	bacilo	p	n	n	3	am	i	sim	brilho	3	am	i	não	<i>Bacillus sp.</i>	100
	3	x	x	bacilo	p	n	n	4	trsp	i	não	brilho	4	am	i	sim	<i>Bacillus sp.</i>	100
14	1	x	x	bacilo													<i>Bacillus sp.</i>	100
	2	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	brilho	8	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	3	x	x	bacilo	p	n	n	5	cnz	i	não	brilho	3	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
15	2	x	x	bacilo	p	n	n	3	cnz	i	não	opaco	4	am	i	não	<i>Bacillus licheniformis</i>	99

16	4	x	x	bacilo	p	n	n	4	bca	i	não	brilho	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
	5		x	bacilo	p	n	n	5	bca	i	não	brilho	3	am	i	não	<i>Brevibacillus sp.</i>	100
	6	x	x	bacilo	p	n	n	4	bca	i	não	opaco	4	am	i	sim	<i>Bacillus sp.</i>	100
	7		x	bacilo	p	n	n	punt	trsp				2	bca	i	não	<i>Paenibacillus sp.</i>	99
17	1	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	opaco	4	bca	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
18	5	x	x	bacilo	p	n	n	5	cnz	r	sim	opaco	2	am	i	não	<i>Bacillus sp.</i>	100
20	1	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	r	não	opaco	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
	3	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	opaco	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	7	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	opaco	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	9	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	opaco	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	10	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	opaco	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	11	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	opaco	4	am	i	sim	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	12		x	bacilo	p	n	n	2	bca	r	não	brilho	3	am	r	não	<i>Paenibacillus sp.</i>	99
21	13	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	opaco					<i>Bacillus licheniformis</i>	100
	2	x	x	bacilo	p	n	n	4	cnz	i	não	brilho	3	am	r	não	<i>Bacillus sp.</i>	99
	4		x	bacilo	p	n	n	2	bca	r	não	brilho	4	bca	i	não	<i>Bacillus circulans</i>	100
	5		x	bacilo	p	n	n	1	trsp	r	não	brilho	2	bca	r	não	<i>Paenibacillus sp.</i>	100
		x	bacilo	p	n	n	3	bca	i	não	brilho	2	am	r	brilho	<i>Bacillus sp.</i>	100	

Legenda:

N. = Número da cepa	Prot. = Proteólise	Lipo. = Lipólise	Cat. = Catalase
Coag. = Coagulase	Oxi. = Oxidase	(mm) = Tamanho da colônia em milímetros	Hem. = hemólise
Bri./Op. = Colônia brilhante ou opaca	ID = Percentual de identidade de nucleotídeos	p = positivo	n = negativo
bca = branca	cnz = cinza	am = amarela	trsp = transparente
vrđ = verde	sc = sem crescimento	punt = puntiforme	i = irregular
r = regular			