

ANDERSON KEIZO YAMAZI

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE E DO POTENCIAL
PROTEOLÍTICO DE *Pseudomonas* spp. ISOLADOS DE LEITE DE
CABRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

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

T

Y19c
2012

Yamazi, Anderson Keizo, 1983-
Caracterização da atividade e do potencial proteolítico de
Pseudomonas spp. isolados de leite de cabra / Anderson Keizo
Yamazi. – Viçosa, MG, 2012.
xiv, 60f. : il. ; 29cm.

Orientador: Luís Augusto Nero
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 50-60

1. Microbiologia veterinária. 2. Leite de cabra. 3. Leite -
Qualidade. 4. Leite - Microbiologia. 5. Psicotrópicos.
6. *Pseudomonas* spp. 7. Enzimas proteolíticas. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896

ANDERSON KEIZO YAMAZI

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE E DO POTENCIAL
PROTEOLÍTICO DE *Pseudomonas* spp. ISOLADOS DE LEITE DE
CABRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADO: 31 de agosto de 2012

Prof. Luciano dos Santos Bersot

Prof. Antonio Fernandes de Carvalho

Prof. Luís Augusto Nero
Orientador

Nunca desista de seu sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por me proporcionar momentos enriquecedores.

Agradeço aos meus pais, que embora distantes, me deram força em todos os momentos.

Agradeço as minhas irmãs, principalmente a Eliza, por me apoiar em todos os momentos, por me mostrar o valor das coisas e das pessoas.

Agradeço ao meu orientador, professor Luís Augusto Nero, por ser um exemplo de dedicação à pesquisa e profissionalismo, por sempre estar disponível quando precisei, pelos conselhos, ideias, conversas e por confiar em meu trabalho.

Agradeço aos professores Abelardo e Cidinha, pelas orientações sobre minhas dúvidas e pelos conselhos valiosos.

Agradeço ao professor Antônio Fernandes, pelas explicações sobre dúvidas sobre o meu projeto e por emprestar meios de cultura de seu laboratório para o meu experimento.

Agradeço a galera do LIPOA: Rafaella, Mococa, Fred, Luana, Gabi, Rodrigo, Natália, Petrônio e Camila.

Agradecimento a galera do LDBAC: Vitor, Cristian, Isabel, Marina, Fábio e Pedro.

Agradecimentos a outras pessoas da UFV: Sanelly, Marli, Luciana, Hanna, Andreção entre outros.

Um agradecimento especial a Monique, por ser uma companheira nesses últimos meses de mestrado, me dando força, suporte e apoio em todos os momentos; Valéria, Raquel Thalita, Lara e Mariane, por me ajudarem nas coletas, análises e conversas; Michelle, pelos conselhos e pelas conversas e Letícia, pelas conversas, apoio e por me ajudar nos tramites da conclusão do meu mestrado.

Agradeço aos estagiários: Ricardo, João, Juliana e Mallú pela força nas coletas e nas horas de análise no laboratório.

Agradeço aos funcionários Dagoberto, Luís, Marquinho, Batalha, Renato e Elcio pela ajuda no preparo de meios do meu projeto. Um agradecimento especial a Rosi e Beth, pela dedicação aos alunos da Pós Graduação e pela ajuda em todo o meu período de mestrado.

Agradeço ao pessoal da Tecnologia de Alimentos, principalmente ao Gabriel e Rosângela, por tirar dúvidas do meu projeto e por empréstimo de material para pesquisa.

Agradeço a Solimar e a professora Vanetti, por tirar dúvidas sobre biologia molecular e por empréstimo de cepas de *Pseudomonas*.

Agradeço aos meus amigos de longe, Marília, Filipe, Viny e, principalmente a Paulinha, pelas longas conversas no celular, sempre me apoiando e ajudando nas minhas pesquisas.

Agradeço aos outros amigos que não foram citados, mas que me ajudaram nessa minha caminhada.

Agradeço aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo financiamento do projeto e pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Características do leite de cabra e a situação brasileira	3
2. Qualidade microbiológica do leite de cabra	4
3. Micro-organismos psicrotróficos em leite de cabra	7
3.1. <i>Pseudomonas</i>	8
4. Impactos de proteases de psicrotróficos na qualidade do leite e derivados	11
5. Metodologias de quantificação, detecção e caracterização de psicrotróficos e <i>Pseudomonas</i>	13
OBJETIVOS	16
1. Objetivos gerais	16
2. Objetivos específicos	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Caracterização microbiológica do leite de cabra	17
1.1. Seleção de propriedades rurais e coleta de amostras	17
1.2. Análises microbiológicas	19
1.3. Análise dos dados	20
2. Obtenção de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. com atividade proteolítica, caracterização de seus perfis genéticos e identificação molecular	20
2.1. Coleção de culturas de <i>Pseudomonas</i> proteolíticos	20
2.2. Extração de DNA	21
2.3. Características dos perfis genéticos dos isolados	21
2.4. Identificação das espécies <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> pela técnica de PCR	22
3. Avaliação do potencial e atividade proteolítica dos isolados identificados como <i>Pseudomonas</i> spp.	23
3.1. Identificação do gene <i>apr</i>	23
3.2. Avaliação da atividade proteolítica em diferentes condições de incubação	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
1. Caracterização microbiológica do leite de cabra	25
2. Obtenção de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. com atividade proteolítica, caracterização de seus perfis genéticos e identificação molecular	37
3. Avaliação do potencial e atividade proteolítica dos isolados identificados como <i>Pseudomonas</i> spp.	45
CONCLUSÕES	49

REFERÊNCIAS.....	51
------------------	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. I) Localização do Estado de Minas Gerais no Brasil, II) Localização dos municípios de Belo Horizonte, Viçosa e Muriaé no Estado de Minas Gerais, III) Localização das 12 propriedades rurais selecionadas para coleta de amostras de leite de cabra cru (geo-referenciadas com auxílio do GPS Garmin 60CSx). 17
- Figura 2. Frequências de amostras de leite de cabra cru em diferentes faixas de contaminação por aeróbios mesófilos (I), enterobactérias (II), coliformes (III) e *Escherichia coli* (IV). 31
- Figura 3. Frequências de amostras de leite de cabra cru em diferentes faixas de contaminação por psicrotróficos (I), e psicrotróficos proteolíticos (II). 33
- Figura 4. Frequências de amostras de leite de cabra cru com contagens de psicrotróficos contendo até 25%, 25 a 50%, 50 a 75%, e acima de 75% de psicrotróficos proteolíticos. 34
- Figura 5. Frequências de amostras de leite de cabra cru em diferentes faixas de contaminação por *Pseudomonas* (I), e *Pseudomonas* proteolíticos (II). 36
- Figura 6. Frequências de amostras de leite de cabra cru com contagens de *Pseudomonas* spp. contendo até 25%, 25 a 50%, 50 a 75%, e acima de 75% de *Pseudomonas* proteolíticos. 36
- Figura 7. Dendograma de similaridade gerado considerando os perfis obtidos por rep-PCR de 71 isolados identificados como *Pseudomonas* spp. e obtidos de leite de cabra cru. A combinação de todas as matrizes e o dendograma de similaridade foi obtido utilizando o método da distância média (UPGMA), utilizando o programa Bionumerics 6.6. * Grupos genéticos definidos considerando similaridade mínima entre 80 e 85%. 39
- Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. Na figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, C corresponde o controle positivo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e 1 e 2 corresponde os isolados testados. 41
- Figura 9. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de *Pseudomonas fluorescens*. Na figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, C corresponde o controle positivo (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) e 1 e 2 corresponde os isolados testados. 41

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção do gene *apr*. Na figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, C corresponde o controle positivo (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) e 1 e 2 corresponde os isolados testados.45

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características bioquímicas diferenciais e típicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. fluorescens</i> , e <i>P. putida</i> , principais espécies do gênero <i>Pseudomonas</i> associadas a leite e derivados (Garrity, 2010).	9
Tabela 2. Informações obtidas junto aos produtores rurais e responsáveis pela obtenção de leite de cabra nas 12 propriedades rurais localizadas nas regiões de Viçosa e Muriaé, MG, incluídas no presente estudo.....	18
Tabela 3. Número de amostras de leite de cabra cru coletadas (n) e principais características de produção e higiene de ordenha nas propriedades rurais selecionadas para inclusão no estudo.	27
Tabela 4. Médias de contagens de micro-organismos indicadores de higiene (aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes, e <i>Escherichia coli</i>) por propriedade rural com atividade de caprinocultura leiteira nas regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais. Valores em log UFC/mL.	29
Tabela 5. Médias de contagens de psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos por propriedade rural com atividade de caprinocultura leiteira nas regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais. Valores em log UFC/mL.	32
Tabela 6. Médias de contagens de <i>Pseudomonas</i> e <i>Pseudomonas</i> proteolíticos por propriedade rural com atividade de caprinocultura leiteira nas regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais. Valores em log UFC/mL.	35
Tabela 7. Números de isolados com atividade proteolítica obtidos de amostras de leite de cabra cru provenientes de 12 propriedades rurais das regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais, e semeadas para enumeração de <i>Pseudomonas</i> spp. (ISO 2009), identificados como <i>Pseudomonas</i> spp. por testes bioquímicos.....	38
Tabela 8. Números de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. com atividade proteolítica obtidos de amostras de leite de cabra cru com resultados positivos e negativos em análises de PCR para identificação de genes específicos para <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i> . ..	40
Tabela 9. Frequências de resultados positivos para amplificação de produtos de PCR típicos de <i>P. aeruginosa</i> (249 pb) e <i>P. fluorescens</i> (800 pb) e propriedades rurais onde isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. com atividade proteolítica foram obtidos de leite de cabra cru, agrupados conforme seus perfis genéticos obtidos por rep-PCR.	43

Tabela 10. Frequências de resultados positivos para o gene <i>apr</i> (194 pb) e de avaliação da atividade proteolítica após diferentes condições de incubação em 107 isolados identificados como <i>Pseudomonas</i> spp. proteolíticos obtidos de leite de cabra cru, agrupados conforme seus perfis genéticos obtidos por rep-PCR.....	46
Tabela 11. Frequências de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. proteolíticos obtidos de leite de cabra cru com atividade proteolítica após incubação a 7, 25 e 35 °C, agrupados conforme os resultados obtidos para a presença do gene <i>apr</i>	47

RESUMO

YAMAZI, Anderson Keizo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2012. **Caracterização da atividade e do potencial proteolítico de *Pseudomonas* spp. isolados de leite de cabra.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

A aplicação da refrigeração como ferramenta para conservação da qualidade microbiológica do leite caprino durante a estocagem e transporte determinou a seleção de uma microbiota tipicamente psicotrófica nesse produto. Micro-organismos psicotróficos são potenciais produtores de enzimas proteolíticas, caracterizadas usualmente por serem termo-resistentes, e responsáveis pela deterioração da caseína do leite mesmo após os tratamentos térmicos mais utilizados em laticínios, como a pasteurização e a ultra-alta-temperatura. *Pseudomonas* spp. são considerados os principais micro-organismos psicotróficos e proteolíticos presentes em leite. O presente estudo teve como objetivos avaliar a qualidade microbiológica de leite de cabra, obter isolados de *Pseudomonas* spp. autóctones desse produto e caracterizar sua atividade e potencial proteolítico. Doze propriedades rurais com atividade de caprinocultura leiteira foram selecionadas nas regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais, das quais 61 amostras de leite de cabra foram coletadas e submetidas a análises microbiológicas para contagens de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes, *Escherichia coli*, psicotróficos totais e proteolíticos, e estimativas de *Pseudomonas* totais e proteolíticos. As médias das contagens obtidas para todas as amostras foram: 5,04 log UFC/mL para aeróbios mesófilos, 3,34 log UFC/mL para enterobactérias, 2,85 log UFC/mL para coliformes, 0,22 log UFC/mL para *E. coli*, 3,62 log UFC/mL para psicotróficos totais, 2,73 log UFC/mL para psicotróficos proteolíticos, 3,87 log UFC/mL para *Pseudomonas* e 3,43 log UFC/mL para *Pseudomonas* proteolíticos. Embora a média de aeróbios mesófilos tenha sido inferior ao limite recomendado pela legislação brasileira vigente (5,70 log UFC/mL), as amostras de leite de cabra apresentaram altas contagens de micro-organismos indicadores de higiene, o que demonstra deficiências higiênicas durante as diferentes etapas de produção e estocagem desse produto. Em 22 amostras de leite cru as contagens de psicotróficos proteolíticos representaram mais de 50% das contagens de psicotróficos, indicando o potencial proteolítico desse grupo em leite de cabra. A mesma relação foi observada em relação à presença de atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp., que em 27 amostras essa proporção foi maior que 50% das contagens totais estimadas de *Pseudomonas*. Considerando as placas utilizadas para

enumeração de *Pseudomonas*, 496 colônias que apresentaram atividade proteolítica foram selecionadas, purificadas e as culturas obtidas submetidas aos seguintes testes para identificação preliminar: morfologia pela coloração de Gram, oxidase e fermentação de glicose. Baseado nesses resultados, 107 isolados foram inicialmente identificados como *Pseudomonas* spp., e submetidos a rep-PCR para caracterização de seus perfis genéticos. Considerando taxas de similaridade entre 80 e 85%, 33 perfis genéticos diferentes foram caracterizados; 36 isolados não apresentaram perfil genético com o protocolo de rep-PCR utilizado. Os isolados ainda foram submetidos a PCR para identificação de espécies com primers específicos para *P. aeruginosa* (38 isolados identificados) e *P. fluorescens* (4 isolados); 61 isolados apresentaram produtos de amplificação para ambas as reações, e 4 para nenhuma, e foram considerados como *Pseudomonas* spp. considerando os testes laboratoriais realizados na triagem. Todos os isolados foram submetidos a PCR para detecção do gene *apr*, responsável pela codificação da enzima metaloprotease alcalina, sendo identificados 41 (38,3%) positivos. Mesmo isolados que não apresentaram gene *apr* foram capazes de produzir enzimas proteolíticas a 7, 25 ou 35 °C; todos os isolados foram capazes de produzir proteases a 25 °C, 72 a 7 °C e 85 a 35 °C. Os resultados obtidos permitiram determinar deficiências higiênicas nas etapas iniciais da cadeia produtiva do leite de cabra, além da relevante participação de micro-organismos psicrotóxicos e proteolíticos na microbiota desse produto. A atividade proteolítica de isolados de *Pseudomonas* spp. de leite de cabra foi caracterizada devido a presença do gene *apr* e pela atividade proteolítica em diferentes temperaturas de incubação.

ABSTRACT

YAMAZI, Anderson Keizo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2012. **Characterization of the proteolytic activity and potential of *Pseudomonas* spp. isolates from goat milk.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.p

The application of refrigeration as a tool to preserve the microbiological quality of goat milk during storage and transportation determined the selection of a microbiota typically psychrotrophic in this product. Psychrotrophic microorganisms are potential producers of proteolytic enzymes, usually characterized by being heat resistant and responsible for the deterioration of milk casein even after heat treatments commonly used at dairies, such as pasteurization and ultra-high-temperature. *Pseudomonas* spp. are considered the main psychrotrophic and proteolytic microorganisms present in milk. This study aimed to evaluate the microbiological quality of goat milk, obtain autochthonous *Pseudomonas* spp. isolates of this product and characterize their proteolytic activity. Twelve farms with activity of dairy goat were selected in regions of Muriaé and Viçosa, Minas Gerais, of which 61 samples of goat milk were collected and subjected to microbiological analysis for mesophilic aerobes counts, enterobacteriaceae, total coliforms, *Escherichia coli*, and proteolytic psychrotrophs, and estimatives of total and proteolytic *Pseudomonas*. The mean counts obtained for the samples were: 5.04 log CFU/mL for mesophilic aerobes, 3.34 log CFU/mL for enterobacteriaceae, 2.85 log CFU/mL for total coliforms, 0.22 log CFU/ml for *E. coli*, 3.62 log CFU/mL for total psychrotrophs, 2.73 log CFU/mL for proteolytic psychrotrophs, 3.87 log CFU/mL for *Pseudomonas*, and 3.43 log CFU/mL for proteolytic *Pseudomonas*. Although the average of mesophilic aerobes was below the limit recommended by the present Brazilian legislation (5.70 log CFU/mL), the samples of goat milk showed high counts of hygiene indicator microorganisms, which shows inadequate hygienic procedures during the different stages of production and storage. In 22 samples of raw milk the counts of proteolytic psychrotrophs accounted for over 50% of the counts of psychrotrophic, indicating the proteolytic potential of this group in goat milk. The same relationship was observed concerning the presence of proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. which in 27 samples this ratio was greater than 50% of the estimated total counts of *Pseudomonas*. Considering the plates used for enumeration of *Pseudomonas*, 496 colonies that showed proteolytic activity were selected, purified and the cultures obtained were subjected to the following tests for preliminary identification:

morphology by Gram staining, oxidase and glucose fermentation. Based on these results, 107 isolates were initially identified as *Pseudomonas* spp., and subjected to rep-PCR to characterize their genetic profiles. Considering similarity rates between 80 and 85%, 33 different genetic profiles were characterized; 36 isolates showed no genetic profile with the rep-PCR protocol used. The isolates were also subjected to PCR for identification in species level with specific primers for *P. aeruginosa* (38 isolates identified) and *P. fluorescens* (4 isolates); 61 isolates showed amplification products for both reactions, and 4 for none, and were considered as *Pseudomonas* spp. based on the laboratory tests during screening. All isolates were subjected to PCR for detection of the *apr* gene, responsible for encoding the alkaline metalloprotease enzyme, identifying 41 (38.3%) positives. Even isolates that showed no *apr* gene were capable of producing proteolytic enzymes at 7, 25 or 35 °C; all isolates were able to produce proteases at 25 °C, 72 at 7° and 85 at 35°C. The results made it possible to determine hygienic shortcomings in the initial stages of the production chain of goat milk, besides the relevant participation of psychrotrophic and proteolytic microorganisms in the microbiota of this product. The proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolates of goat milk was characterized due to the presence of the *apr* gene and the proteolytic activity at different incubation temperatures.

INTRODUÇÃO

O leite de cabra é um alimento com alto valor nutritivo, devido a sua composição diversificada, quando comparada ao leite de vaca, quanto a proteínas, vitaminas, sais minerais, além de gordura com alta digestibilidade, sendo usualmente recomendado para consumo por pessoas alérgicas ao leite de vaca, principalmente crianças e idosos. Atualmente esse produto vem adquirindo um mercado crescente, com uma grande variedade de apresentações comerciais, como o leite pasteurizado, longa vida (leite submetido ao processo de ultra alta temperatura, UAT), congelado, ou em pó, além de diversos derivados como queijos finos e leites fermentados. Dessa forma, devido ao potencial comercial do leite de cabra, a caprinocultura leiteira no Brasil vem ganhando grande impulso nos últimos anos. Um reflexo desse desenvolvimento foi à publicação da Instrução Normativa n. 37 em 2000, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), onde foram estabelecidos critérios técnicos e regulamentação para a produção e beneficiamento específicos para o leite de cabra cru e seus derivados.

A adoção de práticas de manutenção e o transporte do leite cru caprino sob refrigeração reduziram a multiplicação microbiana e consequentemente a deterioração desse produto, mas resultou na seleção de micro-organismos psicrótrófos, que são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. Embora importante, a refrigeração do leite aplicada isoladamente não é uma garantia de qualidade, sendo importante que a matéria prima seja obtido sob condições higiênico-sanitárias adequadas para reduzir a contaminação inicial. Nessas condições, a refrigeração possui papel importante para manter baixas contagens de micro-organismos. Quando obtido em condições inadequadas, o leite cru pode conter altas contagens de micro-organismos, incluindo os psicrótrófos, que mesmo em condições de refrigeração podem se multiplicar e produzir suas enzimas deteriorantes. Durante a multiplicação, enzimas proteolíticas e lipolíticas podem ser produzidas e podem determinar processos de deterioração relevantes no leite e em seus derivados.

Dentre os psicrótrófos, o gênero *Pseudomonas* possui um importante papel na deterioração do leite cru. Este gênero apresenta uma alta diversidade genética e versatilidade metabólica, e é encontrado em ambientes naturais, como solo, água doce, ambientes aquáticos; adicionalmente, micro-organismos desse gênero podem ser isolados de equipamentos de ordenha, tubulações, e produtos processados. *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, e *P. putida* são as espécies mais comumente encontradas em

leite e causam importantes prejuízos às indústrias devido à produção de enzimas proteolíticas termorresistentes. Dentre essas enzimas, as metaloproteases são particularmente importantes por degradarem a caseína, o que determina alterações físico-químicas e sensoriais no leite cru e em seus derivados. A capacidade de produzir essas enzimas também é frequentemente utilizada como indicativo do potencial deteriorante de isolados.

Assim, o presente estudo teve como objetivos gerais a avaliação da qualidade microbiológica do leite de cabra produzido nas regiões de Viçosa e Muriaé, Estado de Minas Gerais, e a caracterização da atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. naturalmente presentes nesse produto.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Características do leite de cabra e a situação brasileira

A caprinocultura é uma das atividades mais antigas da civilização humana, e contribuiu para a fixação do homem em primeiros núcleos de assentamento, fornecendo produtos importantes como o leite, a carne e a pele. No Brasil, os primeiros colonos portugueses trouxeram os caprinos no início da colonização, deixando para o país uma importante fonte de suprimento alimentar, principalmente para regiões mais áridas (Cordeiro, 2006).

Por definição, o leite de cabra é o produto de ordenha completa e ininterrupta em condições higiênicas, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados. Nesse caso, o conceito de sadio pode ser creditado aos animais sem sinais clínicos de doenças e/ou resultados positivos de provas diagnósticas indicativas de doenças infecciosas, bom estado de nutrição, e não recebendo medicamentos capazes de determinar resíduos no leite (Brasil, 2000).

Considerando as características nutricionais do leite de cabra, esse produto possui um importante papel na alimentação humana (Haenlein, 2004). O leite de cabra possui peculiaridades como alta digestibilidade, alcalinidade distinta e maior efeito tamponante. A alta digestibilidade é justificada pelo elevado teor de ácidos graxos de cadeia curta e média, o que favorece o esvaziamento gástrico e, em consequência, reduz o aparecimento de refluxo gastro-esofágico (Haenlein, 2004). Além disso, é um alimento bastante utilizado como alternativa na alimentação de crianças e adultos sensíveis ou alérgicos ao leite de vaca. Isto se deve as diferenças existentes entre a proporções dos aminoácidos encontradas no leite das duas espécies (Clark, 2012).

A indústria leiteira caprina compete com os produtos lácteos de outras espécies como bovina, ovina e bubalina. Devido ao grande volume de produção de leite de vaca, associado ao baixo custo de produção e valor de mercado, o leite de cabra e seus derivados são destinados a um nicho de mercado restrito (Haenlein, 2004). A participação do leite de cabra e seus derivados no mercado de produtos industrializados no Brasil, em 2006, eram de apenas 3%, sendo que a maior parte do seu consumo se dava sob condições de leite fluído (94%), seguido de leite em pó (3%) e derivados, como queijos e iogurtes (3%) (Cordeiro, 2006).

Em 2009 o rebanho caprino mundial era de 868.000.000 de cabeças, com uma produção de leite aproximada de 15 milhões de toneladas por ano, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2012). Segundo o Censo Agropecuário (IBGE, 2012), o efetivo do rebanho caprino brasileiro em 2006 foi de 7.107.608 cabeças, correspondendo ao 10º rebanho mundial, com uma produção de aproximadamente 8.000 toneladas de leite de cabra por ano. No Brasil, a caprinocultura é bastante desenvolvida na região Nordeste, que possui 92% do rebanho nacional de caprinos (IBGE, 2012), e é caracterizada como uma atividade de base familiar que vem se desenvolvendo rapidamente, uma vez que o leite de cabra representa uma importante fonte de alimento para famílias de baixo poder aquisitivo e pela alta capacidade produtiva dos animais (leite, carne e couro) em locais com condições desfavoráveis para exploração agrícola e pecuária. Entretanto, Correia et al. (2001) alertaram para a necessidade da melhoria da qualidade e quantidade do leite de cabra no Brasil. Apenas em 2000, com a publicação da Instrução Normativa n. 37 (Brasil, 2000), que o leite de cabra passou a possuir um conjunto de normas específicas para produção e beneficiamento, evidenciando a evolução dessa atividade no Brasil.

Um procedimento importante para adequação da produção leiteira no Brasil, inclusive em relação a leite de cabra, foi a adoção da cadeia do frio entre a produção e a indústria (Brasil, 2000). A conservação do leite cru sob refrigeração é importante para inibir a multiplicação microbiana e consequente deterioração de seus componentes. Especificamente em relação do leite de cabra, a refrigeração é adotada usualmente já nas propriedades rurais, com transporte também sob refrigeração, e até mesmo congelado, devido principalmente às pequenas produções individuais das propriedades rurais. Essa característica, entretanto, determina o acúmulo da produção por vários dias, e mesmo sob refrigeração pode ocorrer o comprometimento de sua qualidade antes do beneficiamento (Ferreira et al., 1992; Agnihotri & Pal, 1996; Perin et al., 2012).

2. Qualidade microbiológica do leite de cabra

A qualidade do leite de cabra é um tema bastante complexo decorrente a diversidade do sistema de produção, alimentos administrados aos animais, estágio de lactação, genética dos animais, higienização do local de ordenha e dos funcionários, e sanidade dos animais, além de outros fatores (Goetsch et al., 2011). O leite é um dos alimentos mais completos da nutrição humana por apresentar elementos essenciais como proteínas, vitaminas, carboidratos, gordura e minerais (principalmente cálcio).

Contudo, o leite é um produto extremamente perecível, sujeito a contaminações por micro-organismos, que durante a sua multiplicação podem determinar alterações físico-químicas, sensoriais e biológicas nesse produto e em seus derivados (Durr, 2004).

A microbiota inicial do leite de cabra cru possui uma importante influência na qualidade desse produto até o seu beneficiamento, assim como nos derivados que serão produzidos (Goetsch et al., 2011). A deterioração do leite é diretamente influenciada pela diversidade e quantidade de micro-organismos presentes na matéria-prima, decorrentes principalmente das condições higiênicas de produção e sanidade dos animais, assim como as condições nas quais esse produto é mantido nas propriedades rurais, transportado até as usinas de beneficiamento, e processado. Nesse sentido, as possíveis combinações das variáveis tempo e temperatura são fundamentais para permitir ou não a multiplicação dos micro-organismos contaminantes e a produção de fatores de deterioração (Fonseca et al., 2006).

Os principais micro-organismos associados a alimentos podem ser classificados em três categorias distintas, segundo a faixa de temperatura ótima para a multiplicação: psicrófilas (multiplicação entre 0 e 15 °C), mesófilas (entre 20 e 40 °C) e termófilas (entre 44 e 55 °C). Além disso, duas outras categorias de micro-organismos são importantes: psicrotróficos, aqueles que conseguem se multiplicar em baixas temperaturas (menores que 7 °C), independentemente de sua temperatura ótima de multiplicação, e os termodúricos, que são os microrganismos capazes de resistir ao processo térmico de pasteurização (Doyle & Beuchat, 2007). Esses grupos de micro-organismos são usualmente pesquisados em alimentos, inclusive leite, para verificação da sua qualidade microbiológica, sendo importantes indicadores das condições higiênicas de produção, e de problemas durante a obtenção e processamento (Doyle & Beuchat, 2007). Nesse sentido, vários outros grupos de micro-organismos podem ser pesquisados em leite, como aeróbios mesófilos, enterobactérias e coliformes, visando à identificação das condições de produção e conservação desse produto, assim como problemas pontuais na cadeia produtiva.

No Brasil, a Instrução Normativa n. 37 (Brasil, 2000) estabelece o limite de 5,7 log UFC/mL para contagem de aeróbios mesófilos em leite de cabra cru. Oliveira et al. (2011) analisaram 96 amostras aleatórias de leite de cabra à granel de pequenas propriedades rurais na região de Cariri, Paraíba, e observaram contagens médias de aeróbios mesófilos de 7,76 log UFC/mL, além de deficiências em práticas higiênicas durante a ordenha no armazenamento do leite. Fonseca et al. (2006), analisando leite de cabra cru de conjunto de tanque de expansão, do Capril da ESALQ-USP, Piracicaba,

após a ordenha da manhã, obtiveram contagens de aeróbios mesófilos entre 3,45 e 5,44 log UFC/mL. Na Grécia, Kondyli et al. (2012), pesquisando 64 amostras de leite de cabra cru de duas propriedades leiteiras observaram contagens de aeróbios mesófilos entre 6,05 e 6,14 log UFC/mL. Na Suíça, Muehlherr et al. (2003), pesquisando 344 amostras de cabra de 403 fazendas de média e pequena produção, observaram média de contagens de aeróbios mesófilos de 4,69 log UFC/mL. Embora contagens de aeróbios mesófilos não permitam identificar precisamente a origem da contaminação microbiológica em leite de cabra, a pesquisa desse grupo é uma importante ferramenta para avaliar as condições higiênicas dos locais de ordenha, armazenamento e beneficiamento, e também permite inferir prováveis problemas em relação ao rendimento industrial e na segurança alimentar do leite (Chambers, 2002).

Os coliformes são bacilos Gram negativos que fermentam a lactose, produzindo ácido e gás. Esse grupo é um importante indicador de condições higiênicas específicas na produção de leite, uma vez que estão associados à contaminação de água e do ambiente de ordenha. Ainda, a maioria dos micro-organismos do sistema digestório dos animais é pertencente a esse grupo, principalmente *Escherichia coli*, determinando que altas contagens no leite possam sugerir a contaminação por fezes (Rey et al., 2006; Mhone et al., 2011). Esses micro-organismos também estão altamente relacionados com os patógenos intestinais presentes nos alimentos. Na atual legislação brasileira (Brasil, 2000), não existem limites para contagens de coliformes em leite de cabra cru. Entretanto, os coliformes devem ser pesquisados em leite de cabra pasteurizado, e não apresentarem contagens superiores a 0,3 log UFC/mL. Gottardi et al. (2008), analisando o leite de cabra cru, resfriado de tanques de expansão, de 8 propriedades na região do vale do Taquari, Rio Grande do Sul, observaram contagens de coliformes totais entre 0 e 6,14 log UFC/mL. Oliveira et al. (2011), analisando amostras de leite de cabra cru de tanques de expansão, localizadas na região de Cariri, nordeste do Estado do Paraíba, detectaram contagens médias de coliformes totais entre 0 e 7,3 log UFC/mL. Em estudo realizado por Morgan et al. (2003), com amostras de leite de cabra cru, armazenadas em tanques de recepção, produzidas na França, Portugal e Grécia, foram observadas contagens médias de coliformes a 7,55, 7,6 e 5,03 log UFC/mL, respectivamente. Contagens elevadas de coliformes podem estar relacionadas principalmente a deficiência higiênica durante a ordenha e contaminação ambiental, e embora sejam sensíveis ao processo de pasteurização, podem determinar alterações físico-químicas e sensoriais no leite, e reduzir a vida de prateleira desse produto após o beneficiamento (Morgan et al., 2003; Doyle & Beuchat, 2007).

3. Micro-organismos psicrotróficos em leite de cabra

A refrigeração do leite logo após a ordenha tem como objetivo reduzir a taxa de multiplicação microbiana. Entretanto, essa operação realizada isoladamente não garante a qualidade microbiológica desse produto, e deve ser obrigatoriamente associado a procedimentos higiênicos que visem reduzir a contaminação microbiana inicial. No processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que na segunda hora após a ordenha, o mesmo deve atingir a temperatura de 4 °C, condição que minimiza, mas não impede, a multiplicação do número de psicrotróficos (Champagne et al., 1994; Chambers, 2002).

Na grande maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila de 5 a 10 °C, o que pode ser considerado um resfriamento marginal do leite, isto é, não atinge a temperatura de 4°C de forma homogêneo em todo o leite ordenhado. Nessa faixa de temperatura ocorre a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos, independente da temperatura ótima de multiplicação. Os principais gêneros de psicrotróficos usualmente isolados em leite e produtos lácteos são *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Listeria*, *Yersinia*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Clostridium* (Sørhaug & Stepaniak, 1997).

Falhas na higienização e o uso de temperaturas de refrigeração acima de 4 °C, associados à estocagem do leite nas propriedades por períodos superiores à 24 horas, podem causar sérios problemas de qualidade nos produtos lácteos fabricados com o leite com alta contagem de bactérias psicrotróficas (Goetsch et al., 2011). Segundo Wiedmann et al. (2000), os psicrotróficos contribuem para a deterioração do leite por produzirem enzimas proteolíticas e lipolíticas, que são secretadas durante a estocagem e antes do processamento. Muitas dessas enzimas podem resistir ao processamento de pasteurização rápida, conduzida a 72 a 75°C por 10 a 15 segundos e, até mesmo ao processo de UAT, que utiliza temperaturas entre 135 e 145 °C por 2 a 5 segundos. A atividade remanescente dessas enzimas pode reduzir a qualidade sensorial e a vida de prateleira dos produtos lácteos fluidos processados, como alterações sensoriais e gelatinização do leite UAT (Chen et al., 2003).

De acordo com Sørhaug & Stepaniak (1997), um dos principais fatores que influencia a qualidade dos produtos lácteos fabricados com matéria prima mantida a 7 °C ou menos por períodos prolongados, é a multiplicação da microbiota psicrotrófica

contaminante produtora de proteases termoestáveis. A inativação completa dessas enzimas pelos tratamentos térmicos adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando a sua elevada termorresistência (Patel & Bartlett, 1988; Owusu et al., 1991).

A conservação do leite recém-ordenhado, em condições inadequadas, como temperatura ambiente ou refrigeração marginal, permitem a rápida multiplicação dos micro-organismos psicrotróficos e seu predomínio na microbiota do produto (Fairbairn & Law, 1986). Segundo Champagne et al. (1994), normalmente é necessário que o leite possua uma contagem de micro-organismos psicrotróficos acima de 6 log UFC/mL para que ocorram alterações sensoriais e físico-químicas evidentes. Fonseca et al. (2006), analisando amostras de leite cru de cabra refrigerado, obtiveram contagens de psicrotróficos totais que variavam entre 3,16 e 5,37 log UFC/mL, com contagens maiores nas amostras de leite conservadas a 10 °C quando comparadas às conservadas a 4 °C. Agnihotri & Pal (1996), analisando amostras de leite cru de cabra para fabricação de queijos, obtiveram contagens médias de psicrotróficos de 2,22 log UFC/mL. Buffa et al. (2001), encontraram contagens médias de psicrotróficos de 5,84 log UFC/mL em leite cru de cabra em um rebanho localizado na Espanha, para pesquisa na fabricação de queijos. A interferência dessa pequena variação na temperatura de refrigeração nas contagens de diferentes grupos de micro-organismos em leite também foi observada por Perin et al. (2012), que observaram baixas contagens em amostras incubadas a 4 °C.

3.1. *Pseudomonas*

Dentre os psicrotróficos, micro-organismos do gênero *Pseudomonas* são importantes agentes de deterioração do leite de cabra cru, por apresentarem um tempo de geração reduzida à temperatura de refrigeração, independente da sua temperatura ótima de geração (McPhee & Griffiths, 2011). *Pseudomonas* pertence ao grupo das gama-proteobactérias e à família Pseudomonadaceae, tendo como características comuns: bastonetes Gram negativos, aeróbios estritos (atualmente algumas espécies foram identificadas como sendo anaeróbios facultativos), não formadores de esporos e possuem um ou mais flagelos polares (Garrity, 2010). Outras características bioquímicas associadas a algumas espécies de *Pseudomonas* estão descritas na Tabela 1.

Tabela 01. Características bioquímicas diferenciais e típicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, e *P. putida*, principais espécies do gênero *Pseudomonas* associadas a leite e derivados (Garrity, 2010).

Característica	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P. fluorescens</i>					<i>P. putida</i>	
	<i>aeruginosa</i>	<i>alcaligenes</i>	<i>cepacia</i>	bio. I	bio. II	bio. III	bio. IV	bio. V	bio. A	bio. B
número de flagelos	1	1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
fluorescência	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
pig. não fluoresc.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
pig. não fluoresc. não difusos	-	d (amarelo)	-	-	-	-	+	-	-	-
multiplicação a 41 °C	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-
multiplicação a 4 °C	-		-	+	+	+	+	+	d	+
acúmulo de poli-β-hidroxibutirato	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
multiplicação autotrófica com H ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
arginina di-hidrolase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hidrólise de gelatina	+	d	d	+	+	+	+	+	-	-
hidrólise de amidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fatores orgânicos para multiplicação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
denitrificação	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
nitrato como fonte de N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lecitinase	-	-	d	+	Fraca	+	+	d	-	-
saprófitos ou oportunistas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fitopatógenos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
parasitas de animais ou humanos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuação da Tabela 1.

Característica	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P. fluorescens</i>					<i>P. putida</i>	
	<i>aeruginosa</i>	<i>alcaligenes</i>	<i>cepacia</i>	bio. I	bio. II	bio. III	bio. IV	bio. V	bio. A	bio. B
utilização da glicose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
trealose	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
2-cetoglutano	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
meso-inositol	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
geraniol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-valina	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+
β-alanina	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose			d							
D-ribose			+							
L-ramnose			d							
sacarato			+							
levulinato			+							
citroconato			+							
meso-tartrato			+							
adonitol			+							
2,3-butileno glicol			+							
m-hidroxibenzoato			+							
triptamina			+							
α-amilamina			+							

+: 90% ou mais cepas positivas; -: 90% ou mais cepas negativas; d: 11 a 89% de cepas positivas.

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* apresentam grande diversidade metabólica (Tabela 1), o que as torna capazes de colonizar uma ampla variedade de nichos. Como exemplos, *P. aeruginosa* é um importante patógeno humano em infecções oportunistas, *P. putida* encontrada em solos e é relacionada a biodegradação, e *P. fluorescens* produz metabólitos secundários que favorecem sua multiplicação em plantas (Garrrity, 2010). Também relacionado à sua diversidade metabólica, *Pseudomonas* spp. possuem alta capacidade em formar biofilmes, por apresentarem flagelos e fímbrias (Simões et al., 2010). Esses fatores, quando concomitantemente presentes, fornecem habilidades para *Pseudomonas* spp. se multiplicar em uma variedade de ambientes, como tubos de alumínio, baldes, torneiras, dentre outros (McPhee & Griffiths, 2011).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* predominam entre os psicrotróficos proteolíticos deterioradores do leite cru (Marchand et al., 2009; Chen et al., 2011). A capacidade de produzir enzimas proteolíticas é bastante variável dentre as espécies e cepas de *Pseudomonas*, possuindo relação direta com a deterioração do leite (Wiedmann et al., 2000; Dogan & Boor, 2003). Durante a estocagem do leite cru sob refrigeração esses micro-organismos conseguem se multiplicar e produzir enzimas proteolíticas termorresistentes, que se mantém viáveis mesmo após processos térmicos empregados na indústria, e promovem a deterioração do leite pasteurizado e outros derivados, como gelatinização e perda de sabor (Sørhaug & Stepaniak, 1997; Rajmohan et al., 2002; Chen et al., 2003). Entre os produtos lácteos refrigerados, *P. fluorescens* é considerada a espécie mais encontrada e está relacionada a defeitos sensoriais, embora outras espécies como *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. putida* também sejam comumente encontradas (Wiedmann et al., 2000; Rajmohan et al., 2002; Dogan & Boor, 2003). Em pesquisa realizada por Craven & Macauleg (1992), amostras de leite pasteurizado contendo *Pseudomonas* spp. apresentaram rápida deterioração quando comparadas a amostras contendo *Ravobacterium* e *Acinetobacter*.

4. Impactos de proteases de psicrotróficos na qualidade do leite e derivados

A baixa qualidade do leite é demonstrada principalmente por alterações sensoriais e físico-químicas, decorrente principalmente de enzimas produzidas por bactérias contaminantes (Chen et al., 2003). Essas enzimas são tipicamente termorresistentes e produzidas por bactérias psicrotróficas em leite antes dos processos térmicos industriais de beneficiamento, principalmente durante o armazenamento do leite e derivados sob

refrigeração. Enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, principalmente na caseína presente no leite, são denominadas de proteases, proteinases, peptidases e enzimas proteolíticas (Sørhaug & Stepaniak, 1997; Chen et al., 2003). Proteases são divididas em dois grupos, as exopeptidases e as endopeptidases, dependendo do sítio de ação (Rao et al., 1998). As proteases atuam internamente na cadeia de polipeptídios e, em função do mecanismo de ação, são classificados em subgrupos serina, cisteína, ácido aspártico e metaloproteases (Chen et al., 2003). Os microrganismos psicrotróficos proteolíticos encontrados em leite produzem metaloproteases, sendo o gene *apr* (responsável pela codificação da metaloprotease alcalina) um bom marcador para identificação dessas bactérias no leite contaminado (Dufour et al., 2008). Estudos científicos demonstraram que o potencial de deterioração de leite por bactérias psicrotróficas pode ser estimado por PCR utilizando primers específicos para o gene *apr*, associado principalmente a *Pseudomonas* spp., embora o processo de produção dessas enzimas ainda não seja totalmente compreendido (Bach et al., 2001; Bach et al., 2002; Martins et al., 2005). O gene *apr* é o responsável pela expressão das principais enzimas proteolíticas de *Pseudomonas* spp., sendo um importante ferramenta para caracterização do potencial deteriorante desse micro-organismo.

Como a temperatura de refrigeração adotada no armazenamento do leite não inibe totalmente a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos, e consequentemente a produção e atividade de enzimas deterioradoras, a adoção de práticas higiênicas durante a obtenção dessa matéria-prima é fundamental para minimizar a contaminação microbiológica. Um exemplo seria o controle do tempo de estocagem do leite cru, considerando que o processo de resfriamento e armazenamento do leite por longos períodos de tempo favorece a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos (Adams et al., 1976; Chen et al., 2003).

Uma característica usual das proteases produzidas por micro-organismos psicrotróficos é a sua termorresistência, que pode ser influenciada por diversos fatores, como a composição molecular específica das diferentes enzimas (Griffiths et al., 1981; Fairbairn & Law, 1986; Margesin & Schinner, 1992; Teh et al., 2011; Zambare et al., 2011). Em diversas proteases, a ausência de cisteína e a interação com cátions bivalentes permitem a recuperação rápida e precisa de sua forma molecular funcional. A exigência de cálcio, ausência de grupamentos sulfídricos, massa molar, alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e conteúdo de cálcio e fósforo são características nas proteases que tornam suas moléculas flexíveis (Fairbairn & Law, 1986). Ao ser desnaturado pela alta temperatura de pasteurização, essas moléculas podem retonar a

sua forma anterior, através de pontes de cálcio, quando ocorre a redução da temperatura. O próprio leite potencializa a termorresistência de proteases de psicrotróficos, provavelmente, em função da presença de íons bivalentes (Griffiths et al., 1981; Fairbairn & Law, 1986).

5. Metodologias de quantificação, detecção e caracterização de psicrotróficos e *Pseudomonas*

A identificação precisa de diferentes grupos de micro-organismos é fundamental para a caracterização adequada das possíveis origens de contaminação nas cadeias produtivas de alimentos, o que facilita o controle de qualidade desses produtos e sua inocuidade. Técnicas fenotípicas e genotípicas são empregadas para a identificação e classificação microbiana, sendo que cada uma dessas técnicas permite certo nível de classificação filogenética, para gênero, espécies e biovar de uma cepa (Louws et al., 1994). Contudo, cada método tem suas vantagens e desvantagens, considerando a facilidade de aplicação, reprodutividade, requerimentos de equipamentos de resolução e tempo de incubação (Akkermans et al., 1995).

Dados da literatura demonstram que ainda não existe um método ideal para enumeração da microbiota psicrotrófica em alimentos. Procedimentos de contagem padrão em placas são tradicionalmente utilizados para detectar bactérias psicrotróficas em leite e derivados, mas estas técnicas exigem placas incubadas a 7 °C por 10 dias, ou 10 °C por 7 dias (Frank & Yousef, 2004). Outros métodos alternativos de incubação são propostos, como incubação de a 21 °C por 25 horas (ISO, 2004). Esses métodos convencionais apresentam como principal desvantagem o excesso de tempo para obtenção de resultados finais, além de demasiado trabalho laboratorial para execução das análises. Entretanto, esses protocolos devem ser obrigatoriamente aplicados em estudos que visam a obtenção de isolados desse grupo.

Métodos baseados em pesquisa de genes específicos no DNA estão surgindo como alternativas confiáveis, simples e acessíveis para identificar e classificar micro-organismos (Rademaker & de Bruijn, 2012). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta poderosa para a análise de um grande número de amostras, devido de sua simplicidade, versatilidade, sensibilidade e reprodutividade. Estudos já demonstraram que a PCR poder ser útil na identificação de micro-organismos psicrotróficos (Furrer et al., 1991; Francis et al., 1998). Com base na hibridização do rRNA-DNA, micro-organismos do gênero *Pseudomonas* spp. foram divididos em

fluorescentes e não fluorescentes (Palleroni et al., 1973). Entre as espécies fluorescentes, *P. fluorescens* é a principal responsável pela deterioração dos alimentos (Ahn et al., 1999). *P. fluorescens* apresenta um grupo muito extenso e heterogêneo sendo dividido em cinco biótipos com base em características fenotípicas (Tabela 1) (Garrity, 2010). Cepas dessa espécie são frequentemente associadas na deterioração dos alimentos e seus derivados devido a sua capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, causando alterações organolépticas e físico-químicas.

Além de testes convencionais para identificação de diferentes espécies, estudos da diversidade microbiana de *Pseudomonas*, e outros micro-organismos, demandam análises que permitam o agrupamento dos isolados obtidos considerando alguns determinantes genéticos. Diferentes técnicas moleculares são usualmente utilizadas para esse fim, como a análise de perfis de plasmídeos, perfis de restrição de DNA, ribotipagem, eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), PCR associada à restrição enzimática (RFLP-PCR), análise de elementos cromossômicos repetidos (rep-PCR), polimorfismo de DNA por amplificação randômica (RAPD), sequenciamento de regiões específicas do DNA, entre outros (Busch & Nitschko, 1999).

A técnica rep-PCR apresenta um bom desempenho para diferenciação de grupos genéticos de isolados do gênero *Pseudomonas* (Sikorski et al., 1999; Schlöter et al., 2000; Ercolini et al., 2010). Essa técnica é baseada na presença de elementos cromossômicos repetidos que são distribuídos aleatoriamente no genoma dos micro-organismos. Primers específicos são construídos visando o anelamento nessas regiões repetidas, com posterior amplificação de fragmentos do DNA e formação de impressões digitais que permitem a diferenciação entre as cepas (Lupski & Weinstock, 1992). Considerando esse princípio, três “famílias” de sequências repetidas de DNA foram descritas: sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic elements) com 35-40 pares de base, e que são conservadas em várias espécies de micro-organismos (Stern et al., 1984); sequências ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements) com 124-127 pares de base, que contêm um elemento repetitivo central invertido altamente conservado e que estão localizadas nas regiões extragênicas do genoma dos micro-organismos (Hulton et al., 1991); e o elemento BOX, com 154 pares de bases (Martin et al., 1992).

A aplicação dessa técnica para agrupamento genético de micro-organismos levou ao desenvolvimento de kits comerciais para rápida análise de isolados. Ratkai et al. (2010) comparou um desses kits, o Diversilab (baseado em rep-PCR), com o PFGE para promover um agrupamento genético de isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de lesões

clínicas; ambas as técnicas permitiram o agrupamento genético adequado dos isolados, evidenciando a maior praticidade de utilização do kit pronto e semi-automatizado baseado em rep-PCR. Cordero et al. (2012) utilizou o mesmo kit para promover um agrupamento genético de isolados de solo e milho identificados como *Pseudomonas* spp., utilizando primers BOX e ERIC, e obteve resultados similares ao PFGE, indicando equivalência entre os métodos. Esse método também pode ser associado a outras técnicas, como RAPD, além de incluir diferentes tipos de primers (REP, ERIC, e BOX), permitindo um agrupamento genético mais preciso, como observado por Ercolini et al. (2010) com isolados identificados como *Pseudomonas* spp. obtidos de produtos cárneos.

OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Caracterizar a qualidade microbiológica do leite de cabra produzido nas regiões de Viçosa e Muriaé, Estado de Minas Gerais, e a atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. naturalmente presente nesse produto.

2. Objetivos específicos

- ✓ Quantificar os principais grupos de microrganismos indicadores de higiene (aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes, *Escherichia coli*), psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, *Pseudomonas*, e *Pseudomonas* proteolíticos em leite de cabra cru produzido nas regiões de Viçosa e Muriaé, localizadas na região da Zona da Mata Mineira.
- ✓ Obter isolados de *Pseudomonas* spp. de leite de cabra com atividade proteolítica.
- ✓ Caracterizar os perfis genéticos dos isolados de *Pseudomonas* spp. e realizar identificação a nível molecular.
- ✓ Detectar o gene *apr* nos isolados identificados como *Pseudomonas* spp. e caracterizar suas atividades proteolíticas em diferentes condições de incubação.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização microbiológica do leite de cabra

1.1. Seleção de propriedades rurais e coleta de amostras

Doze propriedades rurais com atividade de caprinocultura leiteira localizadas nas regiões de Viçosa e Muriaé, Zona da Mata Mineira do Estado de Minas Gerais (Figura 1), foram selecionadas para inclusão no estudo e realização de coletas de amostras de leite de cabra cru. As visitas nas propriedades rurais para coleta de amostras foram realizadas entre agosto e dezembro de 2011.

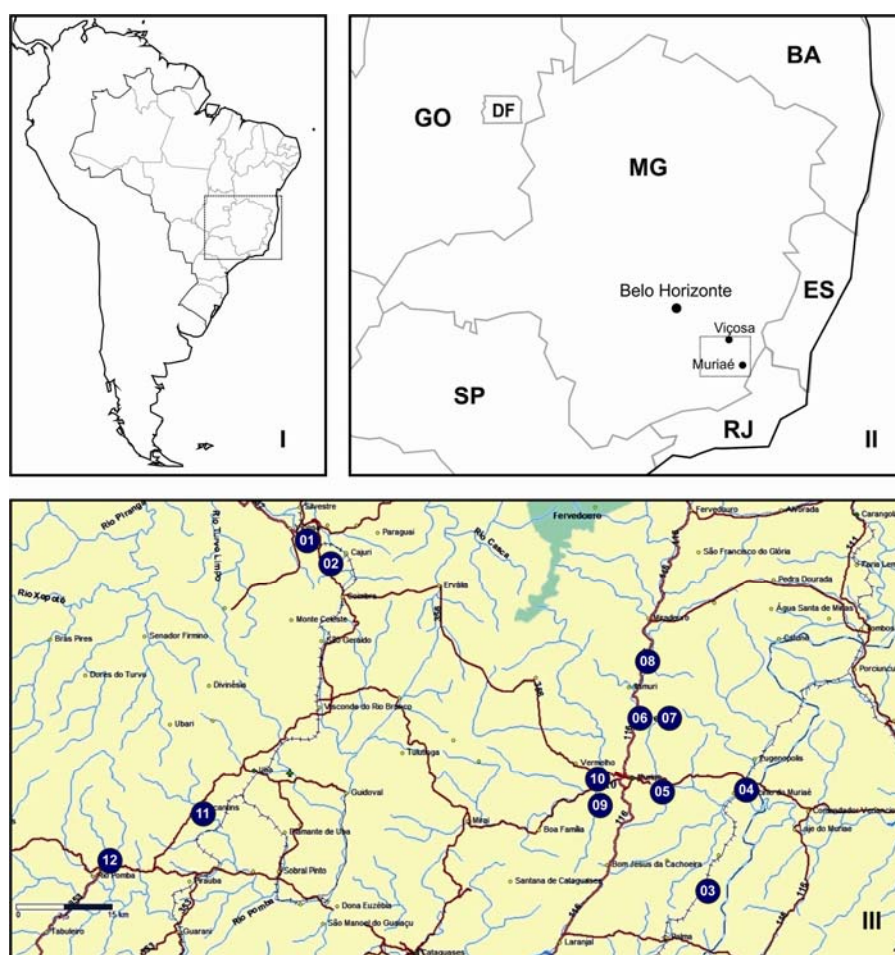


Figura 1. I) Localização do Estado de Minas Gerais no Brasil, II) Localização dos municípios de Belo Horizonte, Viçosa e Muriaé no Estado de Minas Gerais, III) Localização das 12 propriedades rurais selecionadas para coleta de amostras de leite de cabra cru (geo-referenciadas com auxílio do GPS Garmin 60CSx).

A seleção das propriedades rurais foi baseada principalmente no desenvolvimento da atividade de caprinocultura leiteira como prática usual e permanente, além de facilidade de acesso, concordância dos produtores e disponibilidade da produção para coleta. Um questionário foi aplicado aos responsáveis pelas atividades de ordenha e manuseio dos animais nas 12 propriedades selecionadas, visando a determinação das principais características do rebanho, produção, e procedimentos higiênicos adotados. Na Tabela 2 são apresentadas as informações obtidas nessa etapa do estudo.

Tabela 2. Informações obtidas junto aos produtores rurais e responsáveis pela obtenção de leite de cabra nas 12 propriedades rurais localizadas nas regiões de Viçosa e Muriaé, MG, incluídas no presente estudo.

Grupo	Perguntas	Respostas
Dados gerais	Nome da propriedade	<i>Texto</i>
	Nome do proprietário	<i>Texto</i>
	Endereço e contato	<i>Texto</i>
Características da produção	Raça do rebanho	<i>Texto</i>
	Animais em lactação	0-10; 10-100; 100-1000; > 1000
	Sistema de produção	extensivo; semi-intensivo; intensivo
	Tipo de ordenha	mecânico fechado; mecânico aberto; manual
	Produção diária média (L)	0-10; 10-100; 100-1000; > 1000
Higiene da produção	Controle de mastite	sim; não
	Boas práticas na ordenha	pré-dipping; pós-dipping; descarte primeiros jatos; lavagem tetos; lavagem durante ordenha; higiene de ordenhadores
	Conservação do leite	tanque de expansão; tanque de imersão; congelamento; geladeira; temperatura ambiente

Sessenta e uma amostras de leite de cabra cru foram coletadas das propriedades rurais selecionadas, em um mínimo de 3 coletas por propriedade rural. As amostras de leite de cabra cru foram obtidas diretamente dos tanques de expansão ou latões das propriedades rurais, representando o leite de conjunto final obtido após o término da ordenha. Alíquotas de 200 mL da produção leiteira foram coletadas e acondicionadas em frascos estéreis, e transportadas sob refrigeração em até o momento das análises.

1.2. Análises microbiológicas

Todas as amostras coletadas foram submetidas à diluição seriada em escala decimal utilizando solução salina (NaCl 0,85%, m/v) (Wehr & Frank, 2004). Duas diluições foram selecionadas considerando a provável contaminação da amostra integral, e utilizadas para semeadura para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene, enumeração estimada de *Pseudomonas* e *Pseudomonas* proteolíticos.

Aeróbios mesófilos foram enumerados utilizando-se placas Petrifilm™ Aerobic Count (AC, 3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), com incubação a 35 °C por 24 h; após a incubação, todas as colônias vermelhas formadas na área semeada foram enumeradas e o resultado final expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). Enterobactérias foram enumeradas em placas Petrifilm™ *Enterobacteriaceae* (EB, 3M Microbiology), incubadas a 35 °C por 48 h, quando colônias vermelhas associadas a áreas amarelas, com ou sem produção de gás, foram enumeradas e o resultado final expressos em UFC/mL. Coliformes e *Escherichia coli* foram enumerados em placas Petrifilm™ *Escherichia coli* (EC, 3M Microbiology) com incubação a 35°C por 48 h; após a incubação, todas as colônias formadas na área de inoculação (vermelhas e azuis) associadas a gás foram enumeradas como coliformes, e apenas as azuis como *E. coli*, e os resultados finais expressos como UFC/mL.

Psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos foram enumerados conforme Downes & Ito (2001). Aliquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas foram semeadas com auxílio de alça de Drigalski e em duplicatas na superfície de placas contendo ágar padrão de contagem (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) adicionado de leite desnatado (10%, v/v), obtido por hidratação prévia de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) em água esterilizada (10% m/v). Após semeadura por espalhamento, as placas foram incubadas a 7° C por 10 dias, quando todas as colônias formadas foram enumeradas como psicrotróficos, e as colônias que apresentaram halo de proteólise como psicrotróficos proteolíticos. Todos os resultados foram expressos em UFC/mL.

Pseudomonas foram enumerados conforme protocolo ISO/TS 11.059 (ISO, 2009), com modificações para permitir a enumeração de colônias desse grupo capazes de produzir enzimas proteolíticas. Agar base *Pseudomonas* (Oxoid Ltd.) foi preparado e suplementado com penicilina (100.000 UI/L, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pimaricina (0,01 g/L, Coalhopar F-E-B Biotecnologia, Alto Piquiri, PR, Brasil), e leite desnatado (10% v/v, preparado conforme descrito anteriormente). Após

homogeneização, o meio de cultura suplementado foi distribuído em placas de petri estéreis, e após solidificação, alíquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas das amostras de leite foram semeadas em suas superfícies por espalhamento, com auxílio de alça de Driglasky. As placas semeadas foram incubadas a 25 °C por 72 h, quando todas as colônias formadas foram enumeradas para a contagem estimada de *Pseudomonas*, e as que apresentaram halo de proteólise a seu redor proteolíticas consideradas para a contagem estimada de *Pseudomonas* proteolíticas. Os resultados finais obtidos foram expressos em UFC/mL.

1.3. Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados para verificação das principais características dos produtores rurais das regiões estudadas, além das médias das contagens obtidas para cada micro-organismo indicador de higiene e *Pseudomonas*. As contagens obtidas foram comparadas com valores referenciais definidos pela legislação brasileira vigente (Brasil, 2000), e com parâmetros internacionalmente considerados indicadores de condições higiênicas na produção de leite (Chambers, 2002). Adicionalmente, considerando as contagens de psicotróficos e *Pseudomonas* obtidas, foram estabelecidas as porcentagens de colônias proteolíticas em cada grupo observadas para cada amostra. Para apresentação e discussão, todas as contagens obtidas foram convertidas em $\log_{10}$.

2. Obtenção de isolados de *Pseudomonas* spp. com atividade proteolítica, caracterização de seus perfis genéticos e identificação molecular

2.1. Coleção de culturas de *Pseudomonas* proteolíticos

Considerando as placas para enumeração de *Pseudomonas* com atividade proteolítica obtidas na etapa anterior, aquelas que apresentaram entre 30 e 300 colônias foram selecionadas de cada amostra, das quais aproximadamente 10% das colônias formadas que apresentaram halos de proteólise foram transferidas individualmente para ágar *Pseudomonas* (Oxoid) suplementado com penicilina, pimaricina, e leite desnatado, conforme descrito anteriormente. As colônias foram estriadas por esgotamento e incubadas a 25 °C por até 72 h para verificação da pureza, e confirmação de sua atividade proteolítica. Após purificação, os isolados obtidos foram submetidos a

classificação morfológica pela coloração de Gram, fermentação da glicose e teste de oxidase (Downes & Ito, 2001). Os isolados caracterizados como bacilos Gram negativos, fermentadores de glicose, e oxidase positivos foram considerados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (ISO, 2009). Colônias isoladas dessas culturas foram transferidas para caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid, Ltd.) e incubadas a 25 °C por 24 h, quando alíquotas foram divididas para utilização em testes moleculares e para estoques bacterianos (adicionados com glicerol a 20%, v/v, e congelados a -20 °C). Esses isolados formaram uma coleção de culturas bacterianas, que foi utilizada em todas as etapas descritas a seguir.

2.2. Extração de DNA

Volumes de 100 µL das culturas obtidas foram transferidas para tubos contendo 4 mL de TSB (Oxoid Ltd.), e incubados a 25 °C overnight. Em seguida, alíquotas de 1 mL das culturas obtidas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL estéreis e centrifugados a 10.000 x g por 10 min, quando o sobrenadante obtido foi descartado. O pellet contendo a biomassa bacterianas foi submetido à extração de DNA utilizando-se o kit “DNA Purification Kit Wizard Genomic” (Código A11125, Promega Corp., Madison, USA). Após a extração, os DNAs totais foram misturados com corante GelRed 20 X (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) na proporção 3:1 e o corante de LoadDye (Promega Corp.) na proporção de 3:2, e em seguida submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X e visualizados sob luz Ultra Violeta em trans-iluminador. O material genético extraído foi utilizado em todos os estudos moleculares descritos a seguir.

2.3. Características dos perfis genéticos dos isolados

Todos os isolados foram submetidos às reações de rep-PCR utilizando o protocolo descrito por Louws et al. (1994), com modificações. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para as reações foram: ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). Cada uma das reações foi composta por um total de 25 µL, constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 25 pMol de cada oligonucleotídeo, 1 µL de DNA, e água ultra-pura até completar o volume final. Todas as reações foram conduzidas nas seguintes

condições: 1 ciclo inicial de 95 °C por 7 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 1 min, anelamento 52 °C por 1 min e extensão 65 °C por 8 min e extensão simples final de 65 °C por 15 min. Todos os produtos de rep-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X a 2V/cm por 11 h. Após a eletroforese, o gel ficou banhado em meio contendo GelRed 3X (Biotium Inc.) aproximadamente por 1 h e visualizados sob luz ultravioleta em trans-iluminador, onde foi verificada a presença dos fragmentos amplificados. As imagens dos géis foram gravadas pelo sistema de foto-documentação L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), e analisadas posteriormente utilizando-se o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Bélgica), com os seguintes parâmetros de similaridade: versão de banda de base Dice com tolerância de 10% e utilizando o método de UPGMA para análise dos clusters. Os isolados que apresentaram similaridade mínima entre 80 - 85% foram considerados como pertencentes a um mesmo grupo genético.

2.4. Identificação das espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* pela técnica de PCR

Todos os isolados foram submetidos à identificação molecular por PCR conforme o protocolo descrito por Kurapati et al. (2005), para identificação de *P. aeruginosa*. Os oligonucleotídeos utilizados para as reações foram PsuAF1 (5'-ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTGCT-3') e PsuAR2 (5'-CTTGCGGCTGGTTTTTCCAG-3'), visando a amplificação de um fragmento de 249 pb do gene *oprI*, típico de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizado como controle positivo em todas as reações. Cada uma das reações foi composta por um total de 25 µL, constituída de 12,5 µL de Kit para PCR "Go taq Green Master Mix 2x" (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 1 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. Todas as reações foram conduzidas nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de 94 °C por 2 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 1 min, anelamento 60 °C por 30 s e extensão 72 °C por 1 min e extensão simples final de 72 °C por 7 min. Os produtos amplificados foram misturados com corante de GelRed 20X (Biotium Inc.) na proporção de 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X, e visualizados sob luz ultravioleta em trans-iluminador.

Para a identificação de *P. fluorescens*, todos os isolados foram submetidos às reações de PCR conforme protocolo descrito por Scarpellini et al. (2004), com modificações. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações foram 16SPSEfluF (5'-

TGCATTCAAACTGACTG-3') e 16SPSER (5'-AATCACACCGTGGTAACCG-3'), que amplificam um fragmento de 800 pb do gene 16S DNA, de uma região específica e típica de *P. fluorescens*. *P. fluorescens* ATCC 13525 foi utilizado como controle positivo em todas as reações. Cada uma das reações foi composta por um total de 25 µL, constituída de 12,5 µL de Kit para PCR "Go taq Green Master Mix 2x" (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 1 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. Todas as reações foram conduzidas nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de 94 °C por 2 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 1 min, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão 72 °C por 1 min e extensão simples final de 72 °C por 7 min. Os produtos amplificados foram misturados com corante de GelRed 20X (Biotium Inc.) na proporção de 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X, e visualizados sob luz ultravioleta em trans-iluminador.

3. Avaliação do potencial e atividade proteolítica dos isolados identificados como *Pseudomonas* spp.

3.1. Identificação do gene *apr*

Todos os isolados foram submetidos à PCR para a amplificação de um região específica do gene *apr*, responsável pela produção da enzima metaloprotease alcalina, e associado usualmente a atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. O protocolo utilizado para essa etapa da pesquisa foi o descrito por Bach et al. (2001), com modificações. Os oligonucleotídeos FPapI (5'-TAYGGBTTCAAYTCCAAYAC-3') e RFapI (5'-VGCGATSGAMACRTTRCC-3') foram utilizados nas reações, visando a amplificação de um fragmento de 194 pb. *P. fluorescens* ATCC 13525 foi utilizado como controle positivo em todas as reações. Cada uma das reações foi composta por um total de 25 µL, constituída de 12,5 µL de Kit para PCR "Go taq Green Master Mix 2x" (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 1 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. Todas as reações foram conduzidas nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de 94 °C por 2 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 1 min, anelamento 60 °C por 30 s e extensão 72 °C por 1 min e extensão simples final de 72 °C por 7 min. Os produtos amplificados foram misturados com corante de GelRed 20X (Biotium Inc.) na proporção de 5:1, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X, e visualizados sob luz ultravioleta em trans-iluminador.

3.2. Avaliação da atividade proteolítica em diferentes condições de incubação

Todos os isolados foram submetidos a testes fenotípicos para verificação da atividade proteolítica em diferentes temperaturas de incubação. Alíquotas de 100 µL de cada isolado foram transferidas para 4 mL de TSB (Oxoid Ltd.) e incubadas a 25 °C overnight. Em seguida, alíquotas de 1 µL de cada uma das culturas obtidas foram semeadas pontualmente em triplicata em placas de petri contendo agar tripticase de soja (TSA, Oxoid Ltd.) suplementado com leite desnatado (10%, v/v, preparado conforme descrito anteriormente), previamente distribuído e solidificado. Cada uma das repetições das placas semeadas foi incubada em uma das seguintes condições: 7 °C por 10 dias, 25 °C por 72 h, e 35 °C por 48 h. Após os períodos de incubação descritos, 8 mL de ácido clorídrico (1 %, v/v) foi adicionado sobre as placas, com descarte após 1 min, quando foi verificado a formação de halos de proteólise ao redor dos pontos onde as culturas foram inoculadas e formaram colônias (Downes & Ito, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização microbiológica do leite de cabra

O questionário aplicado aos responsáveis pelas atividades relacionadas à caprinocultura leiteira permitiu a caracterização dessa atividade nas 12 propriedades rurais incluídas no estudo. As características observadas, assim como o número de amostras de leite cru coletadas em cada uma das propriedades rurais, estão detalhadas na Tabela 3. Predominantemente, o sistema de criação das cabras leiteiras é realizado de forma intensivo (100%), sendo seus rebanhos compostos por animais de raça Saanen (91%) e Parda Alpina (9%).

A média de animais em lactação por propriedade está entre 1 - 10 (9%) e 10 - 100 (91%) cabeças, com produção média de leite de cabra entre 10 - 100 (50%) e 100 - 1000 (50%) litros de leite por dia. A ordenha manual foi o procedimento de obtenção de leite mais relatado pelos produtores (58%), assim como o sistema de refrigeração da produção em tanques de imersão (50%). Em relação ao manejo sanitário, o controle de mastite por provas rotineiras (como o California Mastitis Test, CMT) foi descrito em 8 propriedades rurais (66%). Relacionado a esse aspecto, algumas práticas higiênicas durante a ordenha foram descritas pelos produtores rurais: pré-dipping (6 propriedades rurais), pós-dipping (9), descarte dos primeiros jatos (8), lavagem dos tetos antes do início da ordenha (5) e ao final da ordenha (11), e higienização constante do local de ordenha (10).

Os dados obtidos permitem a definição de um perfil da atividade de caprinocultura leiteira na região de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais, onde o estudo foi conduzido. De maneira geral, essa atividade pode ser considerada como tipicamente desenvolvida por pequenos ou médios produtores rurais, o que pode ser observado pela produção média relatada e número de animais em lactação. Os procedimentos de obtenção e conservação do leite, assim como as práticas higiênicas adotadas durante a ordenha, demonstram que a caprinocultura leiteira na região estudada ainda necessita de mais informações e assistência técnicas para melhoria da qualidade desse produto. Práticas importantes para redução da contaminação microbiológica do leite e também dos animais em lactação, como controle periódico por CMT, lavagem dos tetos antes da ordenha, pré e pós-dipping (Michel et al., 2001; Delgado-Pertiñez et al., 2003; Zweifel

et al., 2005; D'Amico & Donnelly, 2010; Yamazi et al., 2010), são adotados apenas por parte dos produtores rurais.

Tabela 3. Número de amostras de leite de cabra cru coletadas (n) e principais características de produção e higiene de ordenha nas propriedades rurais selecionadas para inclusão no estudo.

Prop.	n	Rebanho	Refrigeração	Produção (litros/dia)	Animais em lactação	Ordenha	Produção	CMT	Higiene de Ordenha					
									Pré-dipping	Pós-dipping	Descarte primeiros jatos	Lavagem tetos	Lavagem ordenha	Higiene funcionários
1	4	Saanen	Expansão	100 – 1000	11 – 100	Mecânica Fechado	Intensivo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
2	4	Saanen	Congelado	100 – 1000	11 – 100	Mecânica Aberto	Intensivo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
3	10	Saanen	Imersão	100 – 1000	11 – 100	Manual	Intensivo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
4	3	Saanen	Expansão	100 - 1000	11 – 100	Manual	Intensivo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
5	9	Saanen	Imersão	100 - 1000	11 – 100	Manual	Intensivo	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
6	5	Saanen	Imersão	10 – 100	11 – 100	Manual	Intensivo	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
7	5	Saanen	Imersão	10 – 100	1 - 10	Manual	Intensivo	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não
8	5	Saanen	Expansão	10 – 100	11 – 100	Mecânica Fechado	Intensivo	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
9	5	Saanen	Expansão	100 - 1000	11 – 100	Manual	Intensivo	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
10	5	Saanen	Imersão	10 – 100	11 - 100	Manual	Intensivo	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim
11	3	Saanen	Expansão	100 - 1000	11 – 100	Mecânica Aberto	Intensivo	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim
12	3	Parda Alpina	Imersão	10 – 100	11 – 100	Mecânica Aberto	Intensivo	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim

Além de serem usualmente reconhecidas como necessárias para obtenção de leite com higiene, essas práticas também são descritas na Instrução Normativa n. 37 (Brasil, 2000), que define os regulamentos técnicos para produção de leite de cabra no Brasil. Gracindo et al. (2011), avaliaram as características da caprinocultura leiteira em 13 propriedades rurais na Região Central do Rio Grande do Norte, e observaram que os proprietários apresentavam baixos índices de instrução educacional, sistema de criação das cabras era predominantemente em sistema extensivo, que demonstra que ainda precisa de um apoio técnico para a produção de qualidade.

Adicionalmente, foi verificado que na grande maioria das propriedades rurais a produção leiteira é estocada sob refrigeração por um período superior a 48 h. Quanto maior for o período de estocagem, mesmo sob refrigeração, maior será a taxa de multiplicação dos micro-organismos contaminantes, especialmente o grupo dos psicotróficos (Martins et al., 2006; Ercolini et al., 2009). Entretanto, os grandes períodos de estocagem do leite nas propriedades rurais ocorrem por um problema logístico da cadeia produtiva de leite de cabra na região: devido ao baixo número de produtores na atividade (comparado com a bovinocultura leiteira) e relativa baixa produção leiteira, a coleta regular em pelo menos a cada 48 h não é financeiramente viável para as indústrias que captam essa produção. Provavelmente baseado nessa característica da produção de leite de cabra, que também é comum em outras regiões do Brasil (Costa et al., 2010; Oliveira et al., 2011), a legislação vigente não determina um período máximo de estocagem do leite de cabra sob refrigeração nas propriedades rurais (Brasil, 2000).

A estocagem do leite por elevados períodos nas propriedades rurais, mesmo sob refrigeração, determina um impacto direto na qualidade do leite. Esse período pode determinar uma fragilização das micelas de caseína, com consequente desestabilização hidrofóbica e eletrostática das micelas, o que facilita a sua destruição por enzimas produzidas por micro-organismos psicotróficos (Baglinière et al., 2012). Mesmo os micro-organismos que não possuem características psicotróficas conseguem se multiplicar em menor velocidade (Chen et al., 2003; Wijnands et al., 2006), com consequente produção de metabólitos que comprometerão a qualidade do leite de cabra cru e seus derivados. Embora não defina o período máximo de estocagem em propriedades rurais, a legislação nacional vigente para produção de leite de cabra determina que esse período deve ser definido baseado nas características microbiológicas e físico-químicas do leite cru, obtidas em análises de controle de qualidade na recepção das indústrias (Brasil, 2000). Independente das normas

oficialmente adotadas no Brasil, a conservação do leite cru por longos períodos, mesmo sob refrigeração, não é considerada adequada para a manutenção da qualidade microbiológica desse produto, e pode ser considerada como uma causa para as altas contagens que são observadas nesse produto em estudos científicos (Raynal-Ljutovac et al., 2005; Ercolini et al., 2009).

A enumeração de aeróbios mesófilos é um dos principais determinantes da qualidade microbiológica de leite de cabra e derivados. A legislação brasileira para leite de cabra (Brasil, 2000) estabelece o limite de 500.000 UFC/mL para contagem padrão em placas em leite de cabra cru (o que corresponde à enumeração de aeróbios mesófilos, e a 5,7 log UFC/mL). Considerando os valores médios desse grupo, apenas 2 propriedades rurais apresentaram valores acima do limite estabelecido pela legislação nacional (Tabela 4). Em complementação, apenas 7 (11,5%) amostras de leite de cabra cru apresentaram contagens de aeróbios mesófilos acima de 5,7 log UFC/mL, provenientes de 4 propriedades rurais (Figura 2). Um destaque deve ser dado à propriedade rural 8, onde apenas 1 das 5 amostras de leite cru analisadas apresentou contagem abaixo de 5,7 log UFC/mL. Andrade et al. (2008) encontraram uma contagem média de aeróbios mesófilos de 3,85 log UFC/mL em amostras de leite de cabra cru coletadas no dia da ordenha. Poiatti (2001) encontrou valores entre 4,99 a 5,28 log UFC/mL para leite de cabra recém ordenhado. Kondyli et al. (2012), pesquisando 64 amostras de leite de cabra cru de duas propriedades leiteiras na Grécia, observou contagens de aeróbios mesófilos entre 6,05 e 6,14 log UFC/mL.

Em relação à contagem de enterobactérias, as médias de contagens variaram entre 2,04 e 4,39 logUFC/mL, e a média geral entre as propriedades foi de 3,34 log UFC/mL (Tabela 4). A maior parte das amostras de leite cru apresentaram contagens entre 1.000 e 10.000 UFC/mL (Figura 2). Novamente, a propriedade rural 8 apresentou altas contagens de enterobactérias, acima de 1.000.000 UFC/mL em 3 das 5 amostras de leite cru analisadas. Por não serem usualmente utilizados como indicadores de higiene em diversos países, os trabalhos com dados de contagens de enterobactérias em alimentos são relativamente escassos, assim como em leite de cabra. Em um estudo realizado na Grécia, Kondyli et al. (2012) observou contagens de enterobactérias em leite de cabra variando entre 3,60 e 3,72 log UFC/mL, indicando níveis de contaminação semelhantes aos observados no presente estudo.

Tabela 4. Médias de contagens de micro-organismos indicadores de higiene (aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes, e *Escherichia coli*) por propriedade rural com atividade

de caprinocultura leiteira nas regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais. Valores em log UFC/mL.

Propriedades	n	Aeróbios Mesófilos	Enterobactérias	Coliformes	<i>E. coli</i>
1	4	5,11	2,13	2,82	0,54
2	4	4,85	3,87	3,63	0,00
3	10	4,92	3,93	3,38	0,14
4	3	5,49	4,01	2,92	0,90
5	9	5,01	3,79	2,96	0,55
6	5	4,47	2,36	2,53	0,00
7	5	4,05	2,04	1,25	0,20
8	5	6,12	4,16	2,76	0,20
9	5	4,59	3,19	2,98	0,20
10	5	4,70	2,21	2,48	0,00
11	3	5,42	3,97	2,75	0,00
12	3	5,76	4,39	3,77	0,00
Média Geral		5,04	3,34	2,85	0,22

Embora a legislação nacional não determine valores referencias para coliformes em leite de cabra cru, a enumeração desse grupo é relevante para a produção leiteira. Para leite cru e derivados, contagens de coliformes acima de 100 UFC/mL indicam práticas de produção inadequadas e contaminação ambiental, e a presença de *E. coli* é considerada preocupante (Chambers, 2002). Entre as propriedades rurais, as médias das contagens de coliformes variaram entre 1,25 e 3,77 log UFC/mL, enquanto a média mais elevada de *E. coli* foi de 0,90 log UFC/mL (Tabela 4). Embora 56 (86,9%) amostras de leite cru tenham apresentado contagens de coliformes acima de 100 UFC/mL, apenas 5 (8,2%) apresentaram *E. coli* em níveis detectáveis pela metodologia utilizada (Figura 2). Picoli et al. (2006) encontraram contagens de coliformes variáveis entre 5,40 e 8,17 log UFC/mL, em leite de cabra utilizado para a fabricação de queijos. Em relação a *E. coli*, Poiatti (2001) encontrou valores entre 0,52 e 0,85 log UFC/mL em leite de cabra recém-ordenhado. Embora as amostras de leite de cabra analisadas no presente estudo apresentem relativa baixa contagens de aeróbios mesófilos e baixos níveis de *E. coli*, as altas contagens de coliformes indicam condições higiênicas inadequadas na produção rural (Tabela 4, Figura 2).

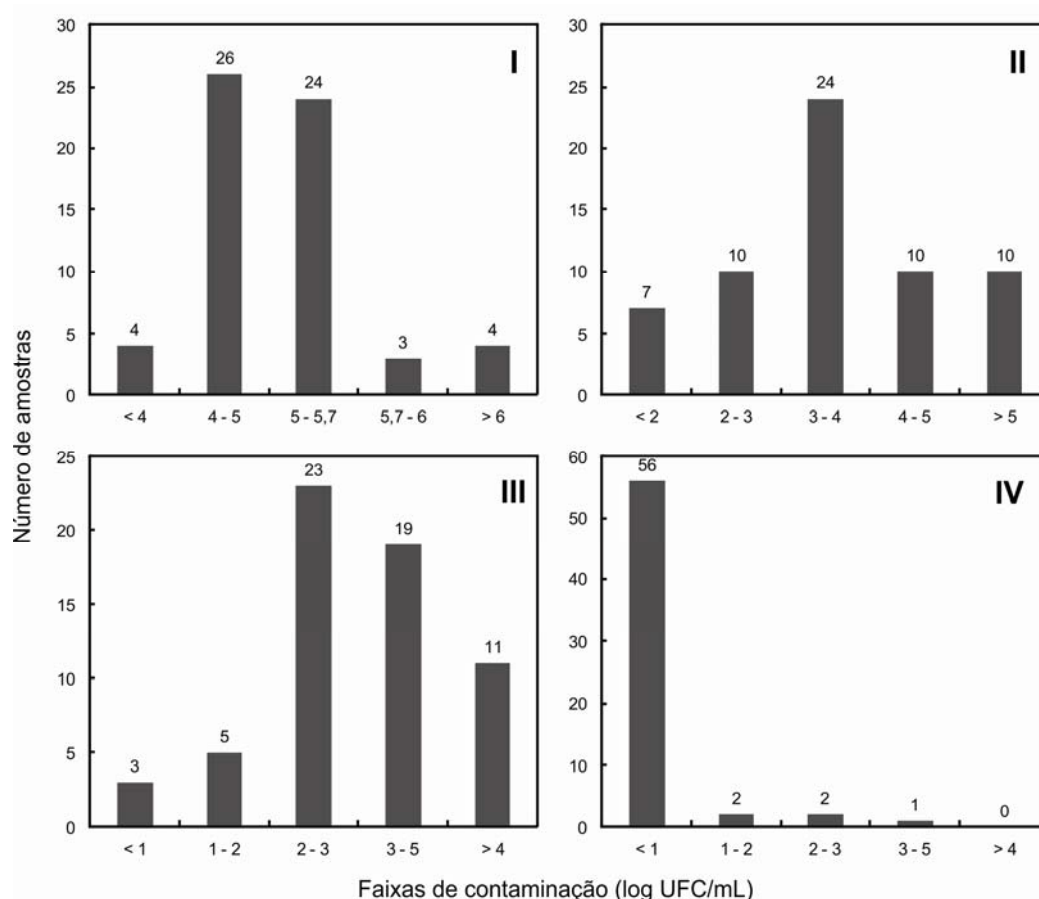


Figura 2. Frequências de amostras de leite de cabra cru em diferentes faixas de contaminação por aeróbios mesófilos (I), enterobactérias (II), coliformes (III) e *Escherichia coli* (IV).

Apesar da refrigeração ser uma prática usualmente adotada para conservação de leite e derivados, inclusive na caprinocultura leiteira, a legislação nacional não inclui esse grupo de micro-organismos nas análises para controle de qualidade e identidade, mesmo para leite de vaca (Brasil, 2000, 2011). Considerando as consequências da refrigeração inadequada para a qualidade do leite e seus derivados, a pesquisa de psicrotróficos seria um importante indicativo das condições de conservação da matéria-prima nas propriedades rurais e também do transporte até as indústrias. As médias das contagens de psicrotróficos nas propriedades rurais incluídas no estudo variaram entre 1,25 e 3,78 log UFC/mL (Tabela 5), com níveis de contaminação mais frequentes variando entre 3 e 5 log UFC/mL (42 amostras, 68,9%, Figura 3). Estudos de psicrotróficos em leite de cabra são bastante escassos, sendo mais usual estudos em leite de vaca; considerando que as características de produção de leite de vaca e cabra são bastantes semelhantes, e devido a ausência de trabalhos científicos com leite de cabra, a comparação dos dados obtidos com a literatura encontrada é pertinente. Arcuri et al. (2008) encontraram variações entre 2 e 7 log UFC/mL nas contagens de psicrotróficos em leite bovino coletado de tanques de expansão coletivos e individuais, e verificou que em

tanques coletivos as contagens foram superiores a 5 log UFC/mL. Pinto et al. (2006) identificaram contagens de psicrotróficos totais em leite cru refrigerado bovino entre 2,3 e 7 log UFC/mL em amostras de tanque individuais. Em estudo realizado por Fagundes et al. (2006), as contagens de psicrotróficos observadas em amostras de leite de cabra coletado no dia da ordenha apresentaram valor média de 4,28 log UFC/mL.

Tabela 5. Médias de contagens de psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos por propriedade rural com atividade de caprinocultura leiteira nas regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais. Valores em log UFC/mL.

Propriedades	n	Psicrotróficos	Psicrotróficos proteolíticos
1	4	3,10	2,88
2	4	2,95	2,91
3	10	3,90	2,19
4	3	4,52	2,99
5	9	4,26	3,69
6	5	2,88	0,96
7	5	2,34	0,94
8	5	4,01	3,15
9	5	4,29	3,88
10	5	2,56	1,34
11	3	4,78	4,34
12	3	3,89	3,46
Média Geral		3,62	2,73

As contagens e níveis de contaminação variados de psicrotróficos observados nas amostras de leite de cabra cru no presente estudo (Tabela 5, Figura 3) indicam condições inadequadas de refrigeração nas propriedades rurais, o que confirma as observações realizadas durante as coletas de amostras, quando foram verificados longos períodos de estocagem da matéria-prima até coleta pelas indústrias. Santana et al. (2001) demonstraram que os principais pontos de contaminação por microrganismos psicrotróficos na cadeia de produção leiteira são água residual dos tanques de expansão e latões; tetos inadequadamente higienizados. Considerando as possíveis fontes de contaminação na cadeia produtiva, Guerreiro et al. (2005) constataram que a adoção de práticas higiênicas contribuem para redução significativa de psicrotróficos em leite bovino.

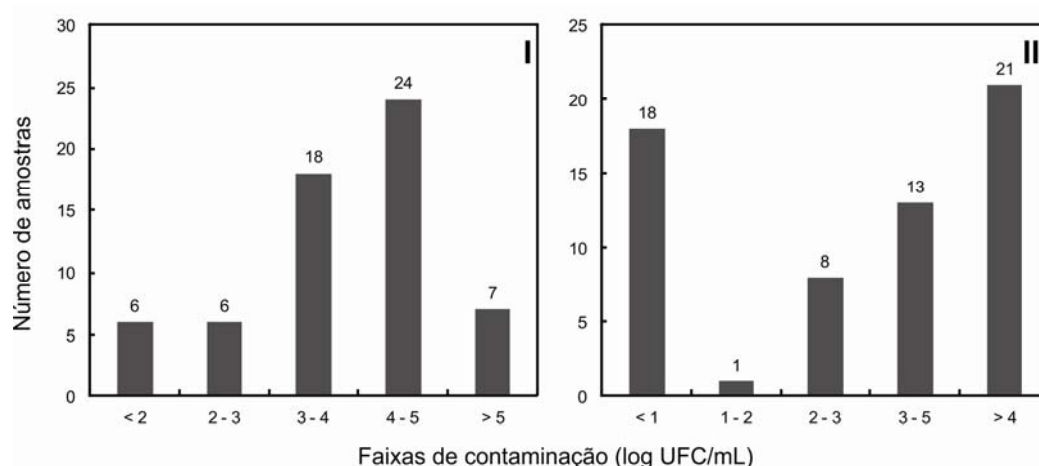


Figura 3. Frequências de amostras de leite de cabra cru em diferentes faixas de contaminação por psicrotróficos (I), e psicrotróficos proteolíticos (II).

Apesar de importante, não existem parâmetros definidos relacionados a níveis adequados ou tolerados de psicrotróficos em leite de cabra, ou mesmo em leite de vaca. Sørhaug & Stepaniak (1997) descreveram em uma revisão as possíveis consequências de diferentes níveis de contaminação por psicrotróficos em leite cru na qualidade de produtos lácteos beneficiados, porém não especificaram exatamente os possíveis grupos de micro-organismos predominantes na matéria-prima. Considerando o potencial deteriorante dos diferentes gêneros de psicrotróficos que usualmente são encontrados em leite cru, estudos mais detalhados e direcionados são necessários para se estimar de maneira adequada os impactos de cada um desses grupos na qualidade de diferentes derivados de leite. Por essa razão, a pesquisa de micro-organismos com características diferenciadas, como proteolíticos, ou gêneros distintos de psicrotróficos, como *Pseudomonas*, é justificada.

Em relação aos psicrotróficos proteolíticos, as médias das contagens observadas nas propriedades rurais variaram entre 0,94 e 4,34 log UFC/mL (Tabela 5), e 34 (55,7%) amostras de leite de cabra cru apresentaram contagens acima de 3 log UFC/mL (Figura 3). Adicionalmente, em 22 (36,1%) amostras de leite de cabra a frequência de colônias proteolíticas nas placas de psicrotróficos foi superior a 50% de todas as colônias formadas, indicando uma participação significativa desse grupo na microbiota psicrotrófica do leite de cabra (Figura 4). Essa taxa de participação de proteolíticos na microbiota psicrotrófica do leite de cabra foi verificada em todas as propriedades rurais em pelo menos uma das amostras analisadas, exceto nas propriedades 6 e 7. Em estudo realizado por Pinto et al. (2006), foram verificadas contagens de psicrotróficos proteolíticos de 4,28 log UFC/mL em leite de vaca obtidos de tanques individuais,

representando 81,2% do total de psicrotróficos enumerados. Fagundes et al. (2006) detectaram contagens de psicrotróficos proteolíticos entre 2,9 e 4,3 log UFC/mL em amostras de leite cru recém ordenhado.

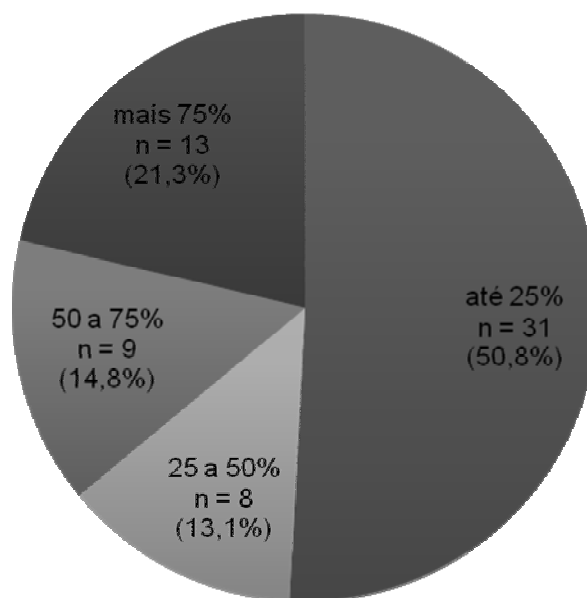


Figura 4. Frequências de amostras de leite de cabra cru com contagens de psicrotróficos contendo até 25%, 25 a 50%, 50 a 75%, e acima de 75% de psicrotróficos proteolíticos.

Micro-organismos do gênero *Pseudomonas* são importantes deteriorantes em leite e derivados, e são os principais psicrotróficos nesses produtos (Marchand et al., 2009). As médias das contagens de *Pseudomonas* spp. e *Pseudomonas* proteolíticos observadas nas propriedades rurais incluídas no presente estudo são apresentadas na Tabela 6, e as frequências de amostras de leite de cabra cru com diferentes níveis de contaminação por esses grupos de micro-organismos são apresentadas na Figura 5. As médias das contagens de *Pseudomonas* spp. variaram entre 2,99 e 4,78 log UFC/mL, e proteolíticos entre 1,90 e 4,61 log UFC/mL (Tabela 6). Esses valores devem ser considerados apenas como referenciais, uma vez que a metodologia ISO 11059 (ISO, 2009) indica a necessidade de confirmação bioquímica de algumas colônias formadas no meio de cultura para definição da concentração exata de *Pseudomonas* spp. na amostra em análise. Assim como observado para a pesquisa de psicrotróficos, os estudos científicos sobre *Pseudomonas* em leite de cabra são escassos; entretanto, devido a características similares na cadeia produtiva e possíveis fontes de contaminação, estudos em leite bovino foram selecionados como referenciais para comparação. Fagundes et al. (2006),

encontraram contagem média de 5,03 log UFC/mL de *Pseudomonas* spp. em leite bovino recém ordenhado, e após refrigeração contagem média de 5,2 log UFC/mL, indicando pequena taxa de multiplicação. Pinto et al. (2006) enumeraram *Pseudomonas* spp. em leite cru refrigerado obtido de tanques de expansão individuais, e encontrou valores médios variáveis entre 1,00 e 6,55 log UFC/mL, indicando grande variação no nível de contaminação por esse grupo.

Tabela 6. Médias de contagens de *Pseudomonas* e *Pseudomonas* proteolíticos por propriedade rural com atividade de caprinocultura leiteira nas regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais. Valores em log UFC/mL.

Propriedades	n	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> proteolíticos
1	4	3,94	3,40
2	4	4,27	3,64
3	10	4,03	3,65
4	3	4,47	4,20
5	9	3,90	3,63
6	5	3,10	1,90
7	5	2,99	2,73
8	5	4,78	4,61
9	5	3,36	3,20
10	5	3,01	2,68
11	3	4,69	2,89
12	3	4,08	3,62
Média Geral		3,87	3,43

Assim como observado para psicrotróficos, não existem valores referenciais que indiquem em que concentrações micro-organismos do gênero *Pseudomonas* podem representar problemas na qualidade dos produtos lácteos. Entretanto, os dados obtidos mostram que a presença marcante de proteolíticos entre *Pseudomonas* spp. presente em leite de cabra cru, confirmando o potencial deteriorante desse gênero (Figura 6); em 37 (60,1%) amostras, a presença de proteolíticos foi superior a 50% das colônias de *Pseudomonas* spp. enumeradas.

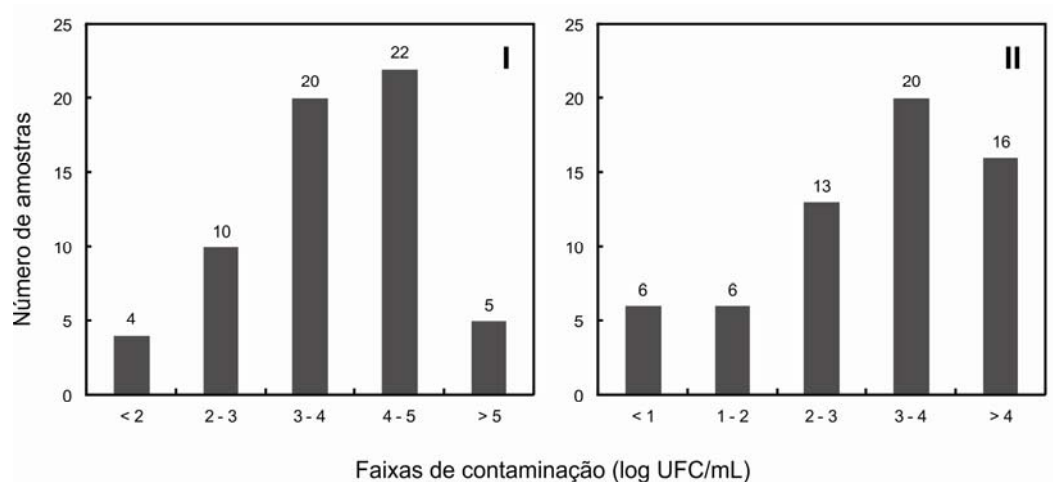


Figura 5. Frequências de amostras de leite de cabra cru em diferentes faixas de contaminação por *Pseudomonas* (I), e *Pseudomonas* proteolíticos (II).

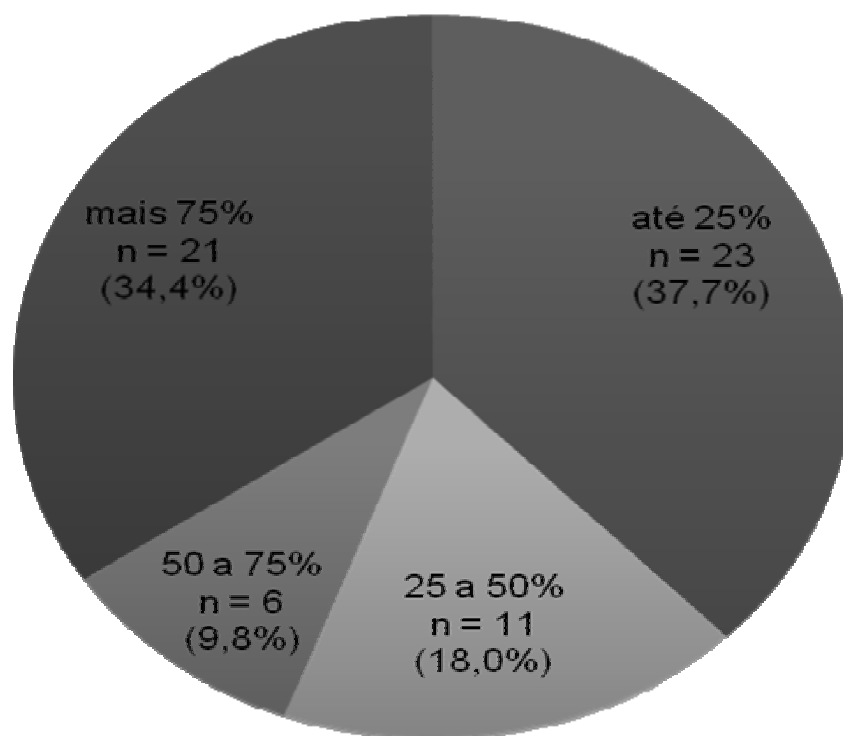


Figura 6. Frequências de amostras de leite de cabra cru com contagens de *Pseudomonas* spp. contendo até 25%, 25 a 50%, 50 a 75%, e acima de 75% de *Pseudomonas* proteolíticos.

Devido a suas características psicrotróficas e capacidade de produção de diversas enzimas proteolíticas (Marchand et al., 2009; Chen et al., 2011), a presença de *Pseudomonas* spp. em leite de cabra é uma evidência de sua relevância como agente deteriorante. Entretanto, não foram encontrados estudos na literatura consultada que procurassem detalhar ou demonstrar o potencial deteriorante desses micro-organismos isolados de leite de cabra.

2. Obtenção de isolados de *Pseudomonas* spp. com atividade proteolítica, caracterização de seus perfis genéticos e identificação molecular

Um total de 496 isolados foi obtido das placas utilizadas para enumeração de *Pseudomonas* spp. pela metodologia ISO 11059 (ISO, 2009). Considerando os objetivos do estudo, apenas as colônias que apresentaram halos de proteólise foram consideradas na seleção para essa etapa do estudo. Após a realização dos testes bioquímicos confirmatórios para *Pseudomonas* spp. (ISO, 2009), 107 isolados apresentaram características típicas desse gênero (bacilos Gram negativos, fermentadores de glicose, e oxidase positivos). Esses resultados indicam a baixa seletividade do meio de cultura recomendado pela ISO 11059, reforçam a necessidade de testes bioquímicos para identificação de colônias representativas formadas nas placas, e indicam que as contagens previamente obtidas devem ser consideradas apenas como valores referenciais da possível contaminação por *Pseudomonas* spp. nas amostras analisadas. Na Tabela 7 são apresentadas as frequências de isolados obtidos de cada uma das propriedades rurais incluídas no estudo, assim como as frequências de isolados confirmados como *Pseudomonas* spp. e os códigos de identificação utilizado para os mesmos. A presença de *Pseudomonas* spp. como relevante na microbiota psicrotrófica de leite foi descrita por Arcuri et al. (2008), que identificou esse gênero por testes bioquímicos (utilizando os kits API 20E e API 20NE) em 43% dos isolados psicrotróficos, com predomínio de *P. fluorescens* (37,6%).

Pela análise de rep-PCR, os 107 isolados identificados como *Pseudomonas* spp. foram agrupados em 33 perfis genéticos distintos considerando grau de similaridade mínima de 80 a 85%. Não foi possível a obtenção de perfis genéticos em 36 isolados. Chapaval et al. (2010) analisaram 40 isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de amostras de água (4), teteiras (3), mãos de ordenhadores (3), tetos (15) e leite de cabra cru (15), em diferentes momentos da ordenha, e pela análise de rep-PCR identificou a presença de 11 perfis genéticos com similaridade entre 80 e 85%. Ercolini et al. (2010), analisando 103 isolados de *Pseudomonas fragi* de carnes bovinas (42), suínas (34) e aves (27), utilizando rep-PCR para correlação entre os perfis genéticos com o tempo estogem e fonte de contaminação, demonstrando a grande diversidade das cepas de *Pseudomonas*. Na Figura 7 é apresentada a similaridade entre os isolados que apresentaram perfil genético por rep-PCR.

Tabela 7. Números de isolados com atividade proteolítica obtidos de amostras de leite de cabra cru provenientes de 12 propriedades rurais das regiões de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais, e semeadas para enumeração de *Pseudomonas* spp. (ISO 2009), identificados como *Pseudomonas* spp. por testes bioquímicos.

Propriedades	Isolados testados	Isolados <i>Pseudomonas</i> spp.	Códigos de identificação
1	36	13	1 - 13
2	34	8	14 - 21
3	87	23	22 - 44
4	26	7	45 - 51
5	83	4	52 - 55
6	26	16	56 - 71
7	36	9	72 - 80
8	46	16	81 - 96
9	27	0	-
10	41	5	97 - 101
11	27	1	102
12	27	5	103 - 107
Total	496	107	1 - 107

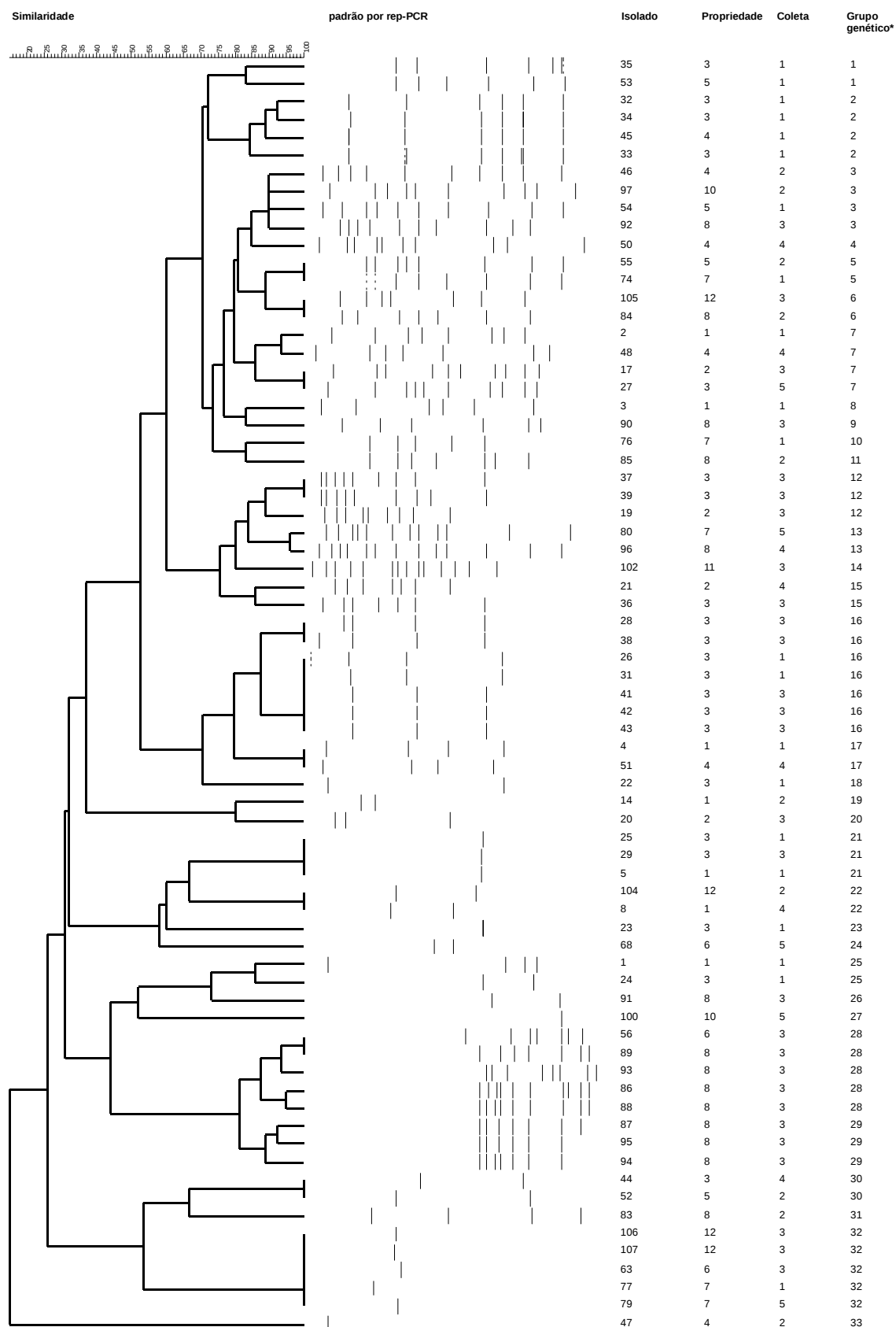


Figura 7. Dendrograma de similaridade gerado considerando os perfis obtidos por rep-PCR de 71 isolados identificados como *Pseudomonas* spp. e obtidos de leite de cabra cru. A combinação de todas as matrizes e o dendrograma de similaridade foi obtido utilizando o método da distância

média (UPGMA), utilizando o programa Bionumerics 6.6. * Grupos genéticos definidos considerando similaridade mínima entre 80 e 85%.

A análise de similaridade dos isolados apresentou algumas características relevantes (Figura 7). Os grupos genéticos definidos considerando taxas de similaridade entre 80 e 85% agruparam entre 1 e 7 isolados, sendo a maioria com apenas 1 isolado, o que indica uma grande diversidade entre os mesmos. O grupo de perfil genético 16 apresentou 7 isolados semelhantes (Figura 7), todos originados da propriedade rural 3 e obtidos em diferentes dias de coleta (1º e 3º coleta); esse resultado indica a persistência desse grupo nas instalações dessa propriedade rural. Os dados dos isolados do grupo genético 32 também demonstram a persistência desse grupo em diferentes ocasiões na propriedade rural 7, além da presença do mesmo grupo em outras propriedades rurais (6 e 12), indicando uma fonte de contaminação comum. A mesma interpretação pode ser realizada em relação a vários outros grupos, inclusive aqueles formados devido a apresentação de perfis genéticos por rep-PCR idênticos (grupos 5, 6, 7, 17, 21, 22, 28, e 30, além do 32). Martins et al. (2006) também observaram uma grande variedade genética entre isolados de piscrotróficos proteolíticos, incluindo *Pseudomonas* spp., obtidos de amostras de leite cru.

Embora tenha sido observado que alguns isolados apresentaram perfis genéticos idênticos (Figura 7), optou-se por incluir todos os 107 isolados identificados como *Pseudomonas* spp. nos estudos moleculares descritos a seguir. As frequências de isolados que apresentaram produtos de amplificação por PCR típicos de *P. fluorescens* (800 pb) e *P. aeruginosa* (249 pb) são apresentadas na Tabela 8. Os aspectos dos produtos de PCR observados em cada uma das reações são apresentados nas Figuras 8 e 9.

Tabela 8. Números de isolados de *Pseudomonas* spp. com atividade proteolítica obtidos de amostras de leite de cabra cru com resultados positivos e negativos em análises de PCR para identificação de genes específicos para *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*.

Produtos de amplificação (pb)	Espécie	N
Apenas 800	<i>P. fluorescens</i>	4
Apenas 249	<i>P. aeruginosa</i>	38
800 e 249	<i>Pseudomonas</i> spp.	61
Ausência	--	4
Total		107

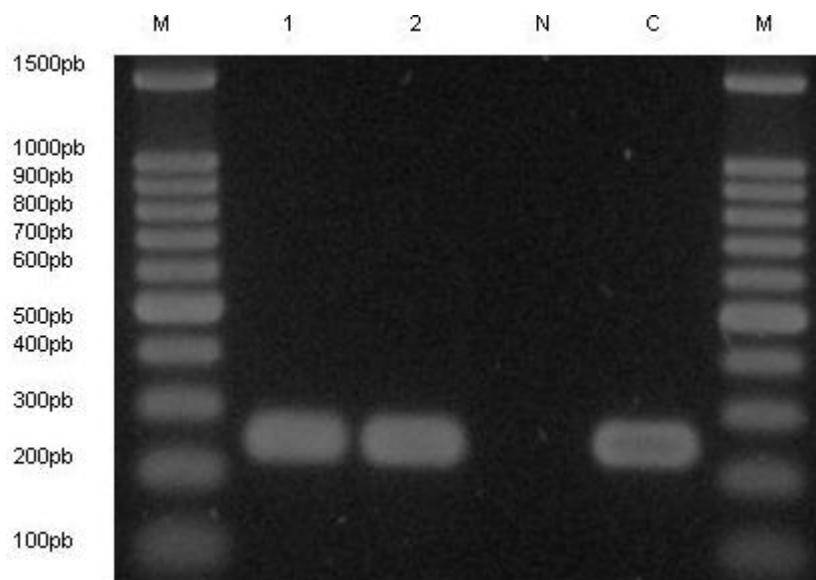


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. Na figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, C corresponde o controle positivo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e 1 e 2 corresponde os isolados testados.

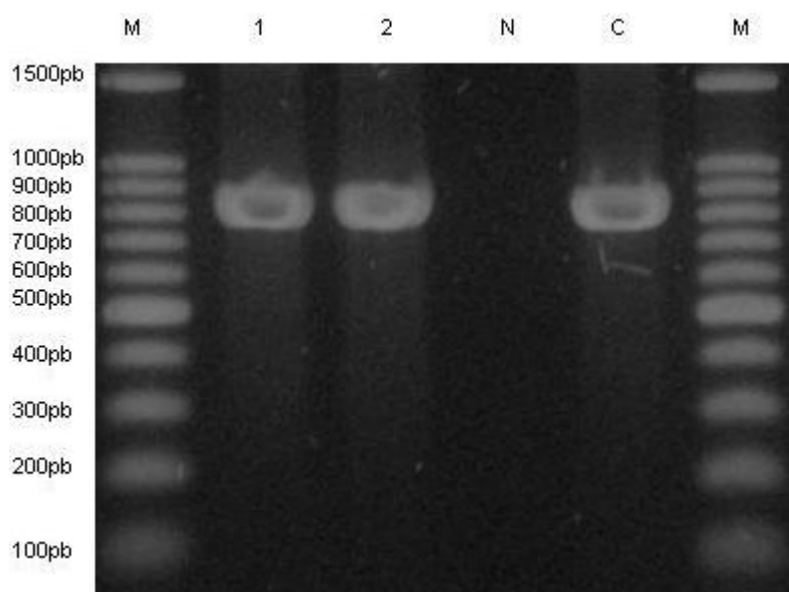


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de *Pseudomonas fluorescens*. Na figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, C corresponde o controle positivo (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) e 1 e 2 corresponde os isolados testados.

Kurupati et al. (2005) definiram as sequências de primers utilizadas para detecção do gene *oprI* para *P. aeruginosa* e avaliaram a sua performance em 73 isolados dessa espécie, e obtiveram especificidade e sensibilidade de 100%. Scarpellini et al. (2004) utilizaram uma região do gene 16S de *P. fluorescens* para definir os primers utilizados

no presente estudo, e avaliaram a performance do protocolo de PCR com várias cepas de *Pseudomonas* spp., e obtiveram especificidade de 100% para a *P. fluorescens*. Embora sejam descritos como altamente específicos para identificação de *Pseudomonas* spp. (Scarpellini et al., 2004; Kurupati et al., 2005), a presença de produtos de amplificação para ambas as reações utilizadas em 61 isolados indicam a baixa especificidade dos primers ou das regiões dos genes-alvo considerados nesses protocolos, além de sugerir uma grande diversidade de *Pseudomonas* spp. nas amostras de leite de cabra cru coletadas, como demonstrados em estudos que relatam uma grande diversidade de nichos desse micro-organismo. Considerando a especificidade descrita nos trabalhos originais onde os protocolos foram descritos, optou-se por confirmar a identificação dos isolados que apresentaram ambos os produtos de amplificação apenas em nível de gênero (*Pseudomonas* spp.), o que demanda estudos complementares para definir precisamente as espécies dos isolados.

Marchand et al. (2009), sugere que o gene *apr* possui uma relativa especificidade para a *P. fluorescens*, principal espécie associada a degradação da caseína do leite devido a produção de enzimas proteolíticas. Considerando que *P. fluorescens* é a espécie mais frequente em leite e derivados, um resultado positivo em leite por um ensaio *apr*-PCR poderia indicar a sua presença na amostra em análise, porém sem excluir a possibilidade da presença de outras espécies do gênero. Em uma revisão de literatura, Deschaght et al. (2011) descreveu vários estudos que avaliaram diferentes primers e genes-alvo para detecção de isolados clínicos de *P. aeruginosa*; embora tenha sido verificado uma variedade nas taxas de especificidade, deve ser considerado que isolados clínicos apresentam características diferentes de isolados naturalmente presentes em alimentos, como o leite de cabra. Assim, os resultados obtidos e os estudos descritos indicam a necessidade de estudos mais detalhados para a identificação adequada e confiável de isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de leite de cabra. Na Tabela 9 são apresentadas as frequências de resultados positivos para cada uma das reações de PCR realizadas para identificação molecular, agrupadas por perfil genético e indicando as origens (propriedades) dos isolados. Considerando os resultados obtidos, é possível identificar que isolados que apresentaram mesmos perfis genéticos foram obtidos de diferentes propriedades rurais, evidenciando a dispersão desses micro-organismos nas regiões de Viçosa e Muriaé, locais onde o presente estudo foi conduzido. A presença de isolados com perfis idênticos em diferentes propriedades rurais indica uma possível fonte de contaminação em comum. Adicionalmente, é possível verificar isolados com diferentes perfis genéticos isolados em cada uma das propriedades rurais, indicando variabilidade de *Pseudomonas* proteolíticos nas propriedades rurais.

Tabela 9. Frequências de resultados positivos para amplificação de produtos de PCR típicos de *P. aeruginosa* (249 pb) e *P. fluorescens* (800 pb) e propriedades rurais onde isolados de *Pseudomonas* spp. com atividade proteolítica foram obtidos de leite de cabra cru, agrupados conforme seus perfis genéticos obtidos por rep-PCR.

Perfil genético*	n	Propriedades rurais	Identificação por PCR	
			<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>
1	2	3, 5	2	2
2	4	3, 4	4	4
3	4	4, 5, 8, 10	3	4
4	1	4	1	1
5	2	5, 7	2	2
6	2	8, 12	2	2
7	4	1, 2, 3, 4	4	2
8	1	1	1	1
9	1	8	1	1
10	1	7	1	1
11	1	8	1	1
12	3	2, 3	1	2
13	2	7, 8	2	2
14	1	11	0	1
15	2	2, 3	1	2
16	7	3	7	7
17	2	1, 4	2	2
18	1	3	1	1
19	1	2	0	1
20	1	2	0	1
21	3	1, 3	2	3
22	2	1, 12	0	2
23	1	3	0	1
24	1	6	0	1
25	2	1, 3	1	2
26	1	8	1	1
27	1	9	0	1
28	5	6, 8	5	4
29	3	8	3	3
30	2	3, 5	2	2
31	1	8	1	1
32	5	6, 7, 12	2	5
33	1	2	2	2
Sem perfil	36	1, 2, 3, 4, 5	10	31

* Perfis genéticos 1 a 33 obtidos por rep-PCR, e apresentados na Figura 7.

Em relação a identificação por PCR de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, os resultados agrupados por perfil genético obtidos por rep-PCR (Tabela 9) confirmam o baixo potencial de diferenciação dos primers utilizados, apresentados anteriormente (Tabela 8). Associados aos dados agrupados por perfis genéticos é possível identificar que os isolados pertencentes a um mesmo grupo compartilham dos mesmos resultados de PCR para identificação, indicando a viabilidade dessa ferramenta para agrupar isolados de *Pseudomonas* proteolíticos; nesse aspecto, foram observadas pequenas variações pontuais, apenas em alguns grupos genéticos (Tabela 9).

A grande diversidade das *Pseudomonas*, tanto nas características fenotípicas, quanto genotípicas, dificultam a identificação exata das espécies desse gênero (Peix et al., 2009), sendo importante a associação de diversas ferramentas para uma maior discriminação entre as cepas, como testes bioquímicos associados com técnicas moleculares como PCR, PFGE, RAPD. Ainda, são necessários estudos mais aprofundados para definição mais precisa de sequências de primers que apresentem maior especificidade, visando a obtenção de resultados confiáveis para identificação e caracterização de isolados de *Pseudomonas*.

Considerando apenas os resultados dos isolados que apresentaram produtos de amplificação típicos somente de *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens* (Tabela 8), seria verificada uma presença marcante de *P. aeruginosa* entre as espécies de *Pseudomonas* proteolíticas presente em leite de cabra cru. Esse micro-organismo, assim como as demais espécies do gênero *Pseudomonas*, já foi descrito como importante deteriorante em leite cru, devido a produção de diversas enzimas proteolíticas que degradam as proteínas do leite, e se mantém estáveis mesmo após os tratamentos térmicos utilizados nas indústrias (Marchand et al., 2009). Em complementação, a identificação das condições ideais para a produção dessas enzimas proteolíticas é importante para se estimar as reais consequências de deterioração do leite de cabra por *Pseudomonas* spp., além de permitir a adoção de práticas adequadas para controlar essa produção. Finalmente, estudos que identifiquem os principais pontos de contaminação por *Pseudomonas* spp. na cadeia produtiva do leite de cabra também são fundamentais para minimizar os níveis desse grupo nos produtos finais; para isso, técnicas moleculares devem ser utilizadas para identificação da persistência de clones de interesse, como aqueles que possuem atividade proteolítica, em pontos específicos da produção, o que permite direcionar procedimentos higiênicos adequados para reduzir a contaminação.

3. Avaliação do potencial e atividade proteolítica dos isolados identificados como *Pseudomonas* spp.

Todos os 107 isolados identificados como *Pseudomonas* spp. com atividade proteolítica foram submetidos a técnica de PCR para identificação de um fragmento de 194 pb de uma região específica do gene *apr*, responsável pela codificação da metaloprotease alcalina (Bach et al., 2001). A pesquisa desse gene é usualmente realizada para se avaliar o potencial proteolítico de isolados psicrotróficos, e pode ser observado em diferentes micro-organismos, como *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Erwinia chrysanthemi*, *P. chlororaphis* e *Flavobacterium-Cytophaga* (Bach et al., 2001; Marchand et al., 2009). Martins et al. (2005) utilizaram os mesmos primers para estimativa do potencial deteriorante em leite cru refrigerado, independente dos micro-organismos carreadores do gene *apr*, o que indica a relevância desse gene para a pesquisa do potencial proteolítico de isolados. Entre os isolados testados, 41 (38,3%) apresentaram produtos de PCR com o tamanho esperado (194 pb) (Figura 10), indicando a presença do gene *apr*.

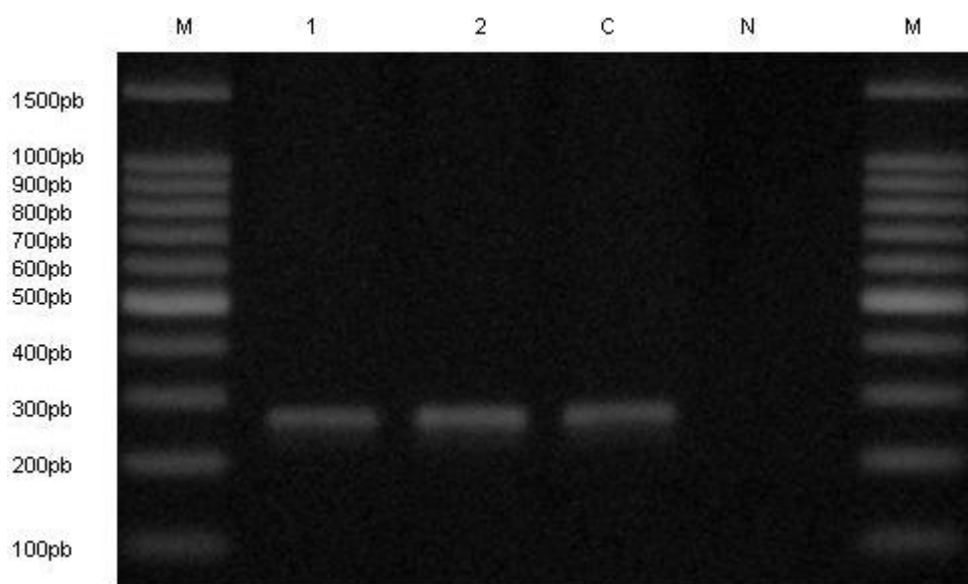


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para detecção do gene *apr*. Na figura, M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb, N corresponde ao controle negativo, C corresponde o controle positivo (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) e 1 e 2 corresponde os isolados testados.

Na Tabela 10 são apresentadas as frequências de isolados que apresentaram resultados positivos pela PCR realizada para detecção do gene *apr*, assim como os resultados fenotípicos de proteólise conduzidos em diferentes temperaturas de incubação, agrupados conforme o perfil genético obtido por rep-PCR (Figura 7).

Tabela 10. Frequências de resultados positivos para o gene *apr* (194 pb) e de avaliação da atividade proteolítica após diferentes condições de incubação em 107 isolados identificados como *Pseudomonas* spp. proteolíticos obtidos de leite de cabra cru, agrupados conforme seus perfis genéticos obtidos por rep-PCR.

Perfil genético*	n	Propriedades rurais	<i>apr</i>	Proteólise		
				7 °C	25 °C	35 °C
1	2	3, 5	2	2	2	1
2	4	3, 4	1	0	4	4
3	4	4, 5, 8, 10	3	4	4	1
4	1	4	0	1	1	1
5	2	5, 7	2	2	2	2
6	2	8, 12	1	2	2	1
7	4	1, 2, 3, 4	3	3	4	2
8	1	1	0	1	1	0
9	1	8	0	1	1	0
10	1	7	0	1	1	1
11	1	8	1	1	1	1
12	3	2, 3	2	3	3	3
13	2	7, 8	1	2	2	1
14	1	11	0	1	1	1
15	2	2, 3	1	1	2	2
16	7	3	5	6	7	6
17	2	1, 4	1	2	2	1
18	1	3	1	1	1	1
19	1	2	0	0	1	1
20	1	2	0	0	1	1
21	3	1, 3	0	3	3	0
22	2	1, 12	0	1	2	2
23	1	3	0	1	1	0
24	1	6	1	0	1	1
25	2	1, 3	1	2	2	2
26	1	8	1	1	1	1
27	1	9	0	0	1	1
28	5	6, 8	4	5	5	5
29	3	8	1	3	3	2
30	2	3, 5	1	2	2	1
31	1	8	1	1	1	0
32	5	6, 7, 12	1	4	5	4
33	1	2	1	1	1	0
Sem perfil	36	1, 2, 3, 4, 5	5	14	36	35

* Perfis genéticos 1 a 33 obtidos por rep-PCR, e apresentados na Figura 7.

Na Tabela 11, são apresentadas as frequências de isolados testados que apresentaram atividade proteolítica nas diferentes condições de incubação avaliadas.

Tabela 11. Frequências de isolados de *Pseudomonas* spp. proteolíticos obtidos de leite de cabra cru com atividade proteolítica após incubação a 7, 25 e 35 °C, agrupados conforme os resultados obtidos para a presença do gene *apr*.

gene <i>apr</i>	N	Incubação	N
Positivo	41	7 °C	35
		25 °C	41
		35 °C	31
Negativo	66	7 °C	37
		25 °C	66
		35 °C	54

A técnica utilizada para agrupar os isolados de *Pseudomonas* proteolíticos obtidos de leite de cabra cru, rep-PCR, não permitiu a associação da presença do gene *apr* com os perfis genéticos identificados (Tabela 10). Numa análise detalhada, pode-se perceber que na maioria das situações nem todos os isolados de um mesmo grupo genético compartilharam o mesmo resultado para a presença do gene *apr*, indicando ausência de relação entre esse gene e o perfil genético definido por rep-PCR. A mesma interpretação pode ser verificada para a produção efetiva de enzimas proteolíticas: independente do grupo genético ao quais os isolados pertencem, houve variação na capacidade de produzir as enzimas proteolíticas (Tabela 10). Todas as metodologias de agrupamento genético possuem limitações, e quanto maior a quantidade de determinantes genéticos incluídos na análise, maiores são as chances de subdivisões e novos agrupamentos (Cordero et al., 2012). Entretanto, embora possuam limitações, essas ferramentas ainda são válidas para demonstrar algumas relações genéticas entre os isolados avaliados, identificar possíveis fontes de contaminação e persistência num determinado ambiente, além de direcionar estudos complementares para identificação ou determinação de características específicas (Albufera et al., 2009). Por esse motivo, as taxas de similaridade entre os isolados podem ser ampliadas ou restringidas, considerando os objetivos da análise (Cordero et al., 2012).

Todos os isolados foram capazes de produzir enzimas proteolíticas quando incubados a 25 °C, confirmando os resultados originalmente observados durante a etapa de triagem (Tabela 11). Esse resultado foi observado mesmo nos isolados que não apresentaram resultado positivo para o gene *apr*. Em relação às demais temperaturas testadas, foram verificadas altas frequências de resultados positivos, independente dos

isolados apresentarem ou não o gene *apr*. A atividade proteolítica em isolados que não apresentaram o gene *apr* é relevante, pois indica a capacidade de produzir outras enzimas proteolíticas além das metaloproteases alcalinas. Embora o gene *apr* seja um bom indicador da atividade proteolítica (Bach et al., 2001; Martins et al., 2005), deve ser considerado que isolados proteolíticos, especialmente *Pseudomonas* spp., são capazes de produzir uma grande diversidade de enzimas. As diferentes enzimas que isolados proteolíticos podem produzir são classificadas considerando seus mecanismos de ação em quatro sub-grupos: serina-proteinases (plasmina), cisteína proteinases (catepsina B), aspártico proteinases (catepsina D) e as metaloproteases (Chen et al., 2003).

Ainda considerando os dados da Tabela 11, pode ser verificado que quando incubado a temperatura de 7 °C, grande parte dos isolados foram capazes de produzir enzimas proteolíticas, independente de possuírem ou não o gene *apr*. Esse dado é importante, pois deve ser considerado que a maioria das propriedades rurais incluídas no estudo conservam a sua produção sob refrigeração em tanques de imersão (Tabela 3), que não são capazes de manter a temperatura do leite cru ordenhado aos 4 °C, indicados pela legislação vigente (Brasil, 2000). Esse procedimento de estocagem possui diversas limitações apontadas em diferentes estudos com leite de vaca (Ercolini et al., 2009; Raats et al., 2011), e a manutenção da matéria-prima em temperaturas consideradas marginais, entre 7 e 10 °C, é uma delas. Nesse contexto, *Pseudomonas* proteolíticos naturalmente presentes no leite de cabra cru poderão produzir enzimas proteolíticas mesmo durante a estocagem sob refrigeração desse produto, o que pode comprometer a qualidade dessa matéria-prima e de seus derivados. A mesma relação pode ser feita para a atividade proteolítica observada pelos isolados quando incubados a 25 e 35 °C: caso ocorra contaminação de derivados de leite estocados a temperatura ambiente, como leite UAT e queijos, esses micro-organismos conseguirão produzir enzimas proteolíticas que poderão comprometer a qualidade desses produtos.

CONCLUSÕES

- ✓ A produção de leite de cabra da região de Viçosa e Muriaé, Minas Gerais, foi caracterizada como pequena a média, predominantemente da raça de rebanho Saanen, sistema de refrigeração por imersão, ordenha manual, sistema intensivo de produção, e apresentou procedimentos higiênicos não padronizados entre as propriedades;
- ✓ Como consequência desse perfil de produção rural, foi verificada uma baixa qualidade microbiológica das amostras de leite de cabra cru analisadas, identificada pelas altas contagens de micro-organismos indicadores de higiene, embora as contagens médias de aeróbios mesófilos ser inferiores ao limite de 500.000 UFC/mL estabelecido pela legislação brasileira em vigência;
- ✓ Foi identificada uma participação marcante de micro-organismos com atividade proteolítica na microbiota psicotrófica total das amostras de leite de cabra cru, provenientes de condições inadequadas de refrigeração e estocagem do leite, realizada principalmente em tanques de imersão e mantida nas propriedades rurais por longos períodos de tempo;
- ✓ Foi identificada uma participação marcante de *Pseudomonas* proteolíticos na microbiota composta por supostos *Pseudomonas* spp., enumerados pela metodologia ISO 11059 modificada;
- ✓ Entre os isolados proteolíticos identificados como *Pseudomonas* spp., foi detectada uma grande variação genética por rep-PCR, sem relação evidente com fatores genéticos supostamente relacionados a *P. fluorescens* ou *P. aeruginosa*; porém, foi possível a identificação de fontes de contaminação em comum em diferentes propriedades rurais, além de persistência de clones em um mesmo ambiente;
- ✓ 38% dos isolados proteolíticos identificados como *Pseudomonas* spp. apresentaram o gene *apr*, associado a codificação da metaloprotease alcalina, porém sem relação com os perfis genéticos observados por rep-PCR;
- ✓ A produção de enzimas proteolíticas foi observada em diferentes temperaturas de incubação por isolados que apresentaram ou não o gene *apr*, indicando produção de outras enzimas além da metaloprotease alcalina, mesmo em temperaturas de refrigeração;
- ✓ A qualidade microbiológica do leite cru de cabra nas regiões de Muriaé e Viçosa atende aos atuais parâmetros determinados pela legislação nacional (Instrução

Normativa nº37), embora as amostras tenham apresentado altas contagens de outros micro-organismos indicadores de higiene (enterobactérias, coliformes, *E. coli* e psicrotróficos);

- ✓ Os resultados apresentados indicam a necessidade de mais estudos sobre os determinantes genéticos de *Pseudomonas* spp., assim como protocolos de cultivo e isolamento desse micro-organismo em leite de cabra;
- ✓ O presente estudo demonstrou a relevância da atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. em leite de cabra cru, que devido às condições de conservação desse produto podem comprometer a sua qualidade e de produtos derivados devido a produção de enzimas proteolíticas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw-milk on milk-proteins and stability of milk-proteins to ultrahigh temperature treatment. *Journal of Dairy Science*, v. 59, p. 823-827, 1976.
- AGNIHOTRI, M.K. PAL, U.K. Quality and shelf-life of goat milk Paneer in refrigerated storage. *Small Ruminant Research*, v. 20, p. 75-81, 1996.
- AHN, J.H.; PAN, J.G.; RHEE, J.S. Identification of the *tliDEF* ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 1847-1852, 1999.
- AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUJIN, F.J., 1995. *Molecular Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht.
- ALBUFERA, U.; BHUGALOO-VIAL, P.; ISSACK, M.I.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. *Infection Genetics and Evolution*, v. 9, p. 322-327, 2009.
- ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; FERREIRA, J.M. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-envase e ao congelamento. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1424-1430, 2008.
- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v. 38, p. 2250-2255, 2008.
- BACH, H.J.; HARTMANN, A.; SCHLOTER, M.; MUNCH, J.C. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *Journal of Microbiological Methods*, v. 44, p. 173-182, 2001.
- BACH, H.J.; TOMANOVA, J.; SCHLOTER, M.; MUNCH, J.C. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*, v. 49, p. 235-245, 2002.

- BAGLINIÈRE, F.; TANGUY, G.; JARDIN, J.; MATÉOS, A.; BRIARD, V.; ROUSSEAU, F.; ROBERT, B.; BEAUCHER, E.; HUMBERT, G.; DARY, A.; GAILLARD, J.L.; AMIEL, C.; GAUCHERON, F. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2593-2603, 2012.
- BRASIL, Instrução Normativa 37 - Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. In: MAPA (ed.), Diário Oficial da União. Brasil, Brasília, DF. 2000.
- BRASIL, Instrução Normativa 62 - Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. In: MAPA (ed.), Diário Oficial da União. Brasil, Brasília, DF. 2011.
- BUFFA, M.; GUAMIS, B.; ROYO, C.; TRUJILLO, A.J. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. *Food Microbiology*, v. 18, p. 45-51, 2001.
- BUSCH, U. NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 722, p. 263-278, 1999.
- CHAMBERS, J.V., 2002. *The Microbiology of Raw Milk*, p. 39-90. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Dairy Microbiology Handbook*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R.; ROY, D.; MAFU, A.A.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophs in dairy-products - Their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 34, p. 1-30, 1994.
- CHAPAVAL, L.C.; OLIVINDO, C.S.; SOUZA, F.G.C.; ALVES, F.S.F.; FROTA, I.M.A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. *Comunicata Scientiae*, v. 1, p. 49-56, 2010.
- CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 255-275, 2003.

- CHEN, T.R.; WEI, Q.K.; CHEN, Y.J. *Pseudomonas* spp. and *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage. *Food Control*, v. 22, p. 697-701, 2011.
- CLARK, S., Comparing milk: human, cow, goat & commercial infant formula. 2012.
- CORDEIRO, P.R.C., Mercado do leite de cabra e de seus derivados, p. 32-43, Revista CFMV. CFMV, Brasília, DF. 2006.
- CORDERO, P.; CAVIGLIASSO, A.; PRÍNCIPE, A.; GODINO, A.; JOFRÉ, E.; MORI, G.; FISCHER, S. Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from maize plants grown in a central region of Argentina. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, p. 342-351, 2012.
- CORREIA, R.C.; MOREIRA, J.N.; ARAÚJO, J.L.P.; RAMOS, C.H.S., Importância social e econômica da caprino-ovinocultura no vale do rio Gavião-BA: elementos para tomada de decisão. Embrapa Semi-Árido. 2001.
- COSTA, R.G.; BERETTA DAL MONTE, H.L.; PIMENTA FILHO, E.C.; HOLANDA JUNIOR, E.V.; BELTRAO DA CRUZ, G.R.; CARRERA MENEZES, M.P. Typology and characterization of goat milk production systems in the Cariris Paraibanos. *Revista Brasileira de Zootecnia - Brazilian Journal of Animal Science*, v. 39, p. 656-666, 2010.
- CRAVEN, H.M. MACAULEY, B.J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage - 1. Identification of types. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 47, p. 38-45, 1992.
- D'AMICO, D.J. DONNELLY, C.W. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 134-147, 2010.
- DELGADO-PERTIÑEZ, M.; ALCALDE, M.J.; GUZMÁN-GUERRERO, J.L.; CASTEL, J.M.; MENA, Y.; CARAVACA, F. Effect of hygiene-sanitary management on goat milk quality in semi-extensive systems in Spain. *Small Ruminant Research*, v. 47, p. 51-61, 2003.
- DESCHAGHT, P.; VAN DAELE, S.; DE BAETS, F.; VANEECHOUTTE, M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 10, p. 293-297, 2011.

- DOGAN, B. BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 130-138, 2003.
- DOWNES, F.P. ITO, K., 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington.
- DOYLE, M.P. BEUCHAT, L.R., 2007. *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington DC.
- DUFOUR, D.; NICODEME, M.; PERRIN, C.; DRIOU, A.; BRUSSEAU, E.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J.-L.; DARY, A. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *International Journal of Food Microbiology*, v. 125, p. 188-196, 2008.
- DURR, J.W., 2004. *Programa nacional de melhoria na qualidade do leite uma oportunidade única*, p. 38-55. In: Durr, J.W., Carvalho, M.P., Santos, M.V. (Eds.), *Compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.
- ERCOLINI, D.; CASABURI, A.; NASI, A.; FERROCINO, I.; DI MONACO, R.; FERRANTI, P.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 142, p. 120-131, 2010.
- ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, v. 26, p. 228-231, 2009.
- FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural*, v. 36, p. 568-572, 2006.
- FAIRBAIRN, D.J. LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria - Their production, properties, effects and control. *Journal of Dairy Research*, v. 53, p. 139-177, 1986.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2012.

- FERREIRA, C.L.L.F.; THAMA, S.F.M.S.; NEUMANN, E. Qualidade microbiológica do leite de cabra armazenado a 4 °C, tratado termicamente e mantido sob refrigeração por sete dias. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 47, p. 37-40, 1992.
- FONSECA, C.R.; PORTO, E.; DIAS, C.T.S.; SUSIN, I. Qualidade do leite de cabra *in natura* e do produto pasteurizado armazenados por diferentes períodos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 944-949, 2006.
- FRANCIS, K.P.; MAYR, R.; VON STETTEN, F.; STEWART, G.; SCHERER, S. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3525-3529, 1998.
- FRANK, J.F. YOUSEF, A.E., 2004. *Tests for Groups of Microorganisms*, p. 227-247. In: Wehr, H.M.Frank, J.F. (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association, Washington.
- FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by invitro amplification of hemolysin gene fragments. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 70, p. 372-379, 1991.
- GARRITY, G., 2010. Genus *Pseudomonas*, p. 323-379. In: Garrity, G. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.
- GOETSCH, A.L.; ZENG, S.S.; GIPSON, T.A. Factors affecting goat milk production and quality. *Small Ruminant Research*, v. 101, p. 55-63, 2011.
- GOTTARDI, C.P.T.; MURICY, R.F.; CARDOSO, M.; SCHMIDT, V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. *Ciência Rural*, v. 38, p. 743-748, 2008.
- GRACINDO, Â.P.A.C.; LARA, I.A.R.; FAÇANHA, D.A.E.; PEREIRA, G.F. Estudo do relacionamento do número de bactérias no leite caprino com práticas de higiene via modelos lineares generalizados. *Revista Brasileira de Biometria*, v. 29, p. 688-698, 2011.
- GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPS, J.D.; MUIR, D.D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 50, p. 289-303, 1981.

- GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, p. 216-222, 2005.
- HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, v. 51, p. 155-163, 2004.
- HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences - A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, v. 5, p. 825-834, 1991.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012.
- ISO, ISO 8552:2004 (IDF 132: 2004) - Milk -- Estimation of psychrotrophic microorganisms -- Colony-count technique at 21 degrees C (Rapid method). ISO, Geneva, Switzerland. 2004.
- ISO, ISO/TS 11059:2009 (IDF/RM 225: 2009) - Milk and milk products -- Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp. ISO, Geneva, Switzerland. 2009.
- KONDYLI, E.; SVARNAS, C.; SAMELIS, J.; KATSIARI, M.C. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Ruminant Research*, v. 103, p. 194-199, 2012.
- KURUPATI, P.; KUMARASINGHE, G.; POH, C.L. Direct identification of *Pseudomonas aeruginosa* from blood culture bottles by PCR-enzyme linked immunosorbent assay using oprI gene specific primers. *Molecular and Cellular Probes*, v. 19, p. 417-421, 2005.
- LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; DEBRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 2286-2295, 1994.
- LUPSKI, J.R. WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA-sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, v. 174, p. 4525-4529, 1992.
- MARCHAND, S.; VANDRIESCHE, G.; COOREVITS, A.; COUDIJZER, K.; DE JONGHE, V.; DEWETTINCK, K.; DE VOS, P.; DEVREESE, B.; HEYNDRICKX, M.; DE BLOCK, J. Heterogeneity of heat-resistant proteases from

- milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, v. 133, p. 68-77, 2009.
- MARGESIN, R. SCHINNER, F. Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychrophilic *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biotechnology*, v. 24, p. 207-210, 1992.
- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERYS, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 3479-3483, 1992.
- MARTINS, M.L.; DE ARAUJO, E.F.; MANTOVANI, H.C.; MORAES, C.A.; VANETTI, M.C.D. Detection of the *apr* gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, p. 203-211, 2005.
- MARTINS, M.L.; PINTO, C.L.O.; ROCHA, R.B.; DE ARAUJO, E.F.; VANETTI, M.C.D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 111, p. 144-148, 2006.
- MCPHEE, J.D. GRIFFITHS, M.W., 2011. *Psychrotrophic Bacteria* | *Pseudomonas spp*, p. 379-383. In: Editor-in-Chief: John, W.F. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. Academic Press, San Diego.
- MHONE, T.A.; MATOPE, G.; SAIDI, P.T. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 223-228, 2011.
- MICHEL, V.; HAUWUY, A.; CHAMBA, J.-F. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait*, v. 81, p. 575-592, 2001.
- MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M.; ROSEIRO, L.; RAVASCO, F.; KANDARAKIS, I.; BONNIN, V.; FISTAKORIS, M.; ANIFANTAKIS, E.; JAUBERT, G.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research*, v. 47, p. 39-49, 2003.

- MUEHLHERR, J.E.; ZWEIFEL, C.; CORTI, S.; BLANCO, J.E.; STEPHAN, R. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 3849-3856, 2003.
- OLIVEIRA, C.J.B.; HISRICH, E.R.; MOURA, J.F.P.; GIVISIEZ, P.E.N.; COSTA, R.G.; GEBREYES, W.A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 98, p. 64-69, 2011.
- OWUSU, R.K.; MAKHZOUM, A.; KNAPP, J. The thermodynamic stability of lipases and proteases from psychrotrophic bacteria. *Food Chemistry*, v. 39, p. 187-195, 1991.
- PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic Acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 23, p. 333-339, 1973.
- PATEL, T.R. BARTLETT, F.M. Heat-stable proteases from psychrotrophic pseudomonads: secondary structure and heat stability. *Food Microbiology*, v. 5, p. 201-211, 1988.
- PEIX, A.; RAMIREZ-BAHENA, M.-H.; VELAZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection Genetics and Evolution*, v. 9, p. 1132-1147, 2009.
- PERIN, L.M.; MORAES, P.M.; ALMEIDA, M.V.; NERO, L.A. Intereference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, p. 333-342, 2012.
- PICOLI, S.U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 64-69, 2006.
- PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 645-651, 2006.
- POIATTI, M.L., 2001. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de leite cru, pasteurizado e congelado de cabra. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Mestrado em Zootecnia.

- RAATS, D.; OFFEK, M.; MINZ, D.; HALPERN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, v. 28, p. 465-471, 2011.
- RADEMAKER, J.L.W. DE BRUIJN, F.J., Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprint and computer-assisted pattern analysis. 2012.
- RAJMOHAN, S.; DODD, C.E.R.; WAITES, W.M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 205-213, 2002.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, p. 597-635, 1998.
- RATKAI, C.; PEIXE, L.V.; GROSSO, F.; FREITAS, A.R.; ANTUNES, P.; FODOR, E.; HAJDU, E.; NAGY, E. Successful application of the DiversiLab repetitive-sequence-based PCR typing system for confirmation of the circulation of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital wards. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 67, p. 202-206, 2010.
- RAYNAL-LJUTOVAC, K.; GABORIT, P.; LAURET, A. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Research*, v. 60, p. 167-177, 2005.
- REY, J.; SANCHE, S.; BLANCO, J.E.; DE MENDOZA, J.H.; DE MENDOZA, M.H.; GARCIA, A.; GIL, C.; TEJERO, N.; RUBIO, R.; ALONSO, J.M. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p. 212-217, 2006.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MOARES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 22, p. 145-154, 2001.
- SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters*, v. 236, p. 257-260, 2004.

- SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, p. 647-660, 2000.
- SIKORSKI, J.; ROSSELLÓ-MORA, R.; LORENZ, M.G. Analysis of Genotypic Diversity and Relationships Among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-Based Genomic Fingerprinting and Multilocus Enzyme Electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 22, p. 393-402, 1999.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, p. 573-583, 2010.
- SØRHAUG, T. STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 35-41, 1997.
- STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive Extragenic Palindromic sequences - A major component of the bacterial genome. *Cell*, v. 37, p. 1015-1026, 1984.
- TEH, K.H.; FLINT, S.; PALMER, J.; LINDSAY, D.; ANDREWES, P.; BREMER, P. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 742-747, 2011.
- WEHR, H.M. FRANK, J.F., 2004. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association, Washington.
- WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S.S.; RALYEA, R.; BOOR, K.J. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 2085-2095, 2000.
- WIJNANDS, L.M.; DUFRENNE, J.B.; ZWIETERING, M.H.; VAN LEUSDEN, F.M. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *International Journal of Food Microbiology*, v. 112, p. 120-128, 2006.
- YAMAZI, A.K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; ORTOLANI, M.B.T.; NERO, L.A. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. *Bioscience Journal*, v. 26, p. 610-618, 2010.

- ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New Biotechnology*, v. 28, p. 173-181, 2011.
- ZWEIFEL, C.; MUEHLHERR, J.E.; RING, M.; STEPHAN, R. Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milk in Switzerland. *Small Ruminant Research*, v. 58, p. 63-70, 2005.