

SOLIMAR GONÇALVES MACHADO

**DETECÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* EM LEITE CRU PELA REACÇÃO  
EM CADEIA DA POLIMERASE**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

SOLIMAR GONÇALVES MACHADO

**DETECÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* EM LEITE CRU PELA REACÇÃO  
EM CADEIA DA POLIMERASE**

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

APROVADA: 15 de julho de 2011.

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Mara Soares Bazzolli  
(Coorientadora)

---

Pesq<sup>a</sup>. Cláudia L. de Oliveira Pinto

---

Prof. Maurilio Lopes Martins

---

Prof. Wendel Batista da Silveira

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo ensino de excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, pela confiança, pela atenção, pelo exemplo de profissionalismo, pela compreensão e pela amizade.

À professora Denise Mara Soares Bazolli, pelas valiosas sugestões, pelo entusiasmo e pela disponibilidade.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pelas sugestões e pelo incentivo.

À doutora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pelas sugestões, especialmente nas análises de eletroforese em gel de poliacrilamida e pela participação na banca examinadora.

Aos professores, Wendel e Maurilio, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do Laticínios FUNARBE por disponibilizarem as amostras de leite cru.

A todos os amigos dos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Anaeróbios, Adriana Leandro, Adriana Ponce, Alexandra, Aline, Ana Íris, Camila, Cláudia Bento, Cláudia Vieira, Débora, Emilene, Evandro,

Fernanda, Gardênia, Maíra Carla, Maíra Galvão, Mônica Pacheco, Mônica Passos, Natan, Ramila, Simone, Uelinton e Wemerson, pela excelente convivência e pelo carinho.

Aos amigos do BIOAGRO, especialmente aos amigos do Laboratório de Genética de Micro-organismos, pela ajuda constante, pela convivência agradável e por compartilharem os equipamentos e o laboratório.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente, Aline, Sr. Cesário, Danilo, Elisabete, Evandro, José Carlos, Nilcéa e Pablo, pelo auxílio constante.

Ao Paulo, pelo amor, pelo apoio, pelo companheirismo, pela paciência e pela compreensão.

Aos meus pais, Lazarino e Maria Helena, e aos meus irmãos, Fernanda, Zaed e Zuleica, grandes incentivadores, pelo amor incondicional, pelo apoio, pela confiança e pela compreensão nos momentos de ausência.

Às amigas, Adriana Leandro, Adriana Ponce e Emilene, pela paciência, pela ajuda nos experimentos e, especialmente, pela amizade.

Aos caros amigos Ciro e Maíra, pela recepção no Laboratório de Genética de Micro-organismos, pela paciência, pelos ensinamentos, pelas tardes de estudo e pela amizade.

À amiga Mayra, companheira de república, pelos seis anos de convivência e paciência e ao Leandro, pelos momentos de descontração e pela amizade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

## BIOGRAFIA

Solimar Gonçalves Machado, filha de Lazarino José Machado Filho e Maria Helena Gonçalves Machado, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais no dia 24 de junho de 1986.

Em julho de 2009, graduou-se como Engenheira de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Impacto da refrigeração na dinâmica da população microbiana do leite cru.....	3
2.2. Proteases produzidas por <i>P. fluorescens</i> .....	6
2.3. Métodos de detecção de micro-organismos psicrotóxicos em leite .....	7
2.4. Métodos de extração de DNA total para análise de leite cru .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo .....	11
3.2. Métodos de extração de DNA total de leite .....	11
3.3. Genes alvo utilizados para detecção de <i>P. fluorescens</i> em leite por PCR.....	14
3.4. Avaliação do método de detecção de <i>P. fluorescens</i> por PCR para análise de leite cru.....	15
3.5. Avaliação da proteólise da caseína das amostras de leite cru .....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
4.1. Avaliação dos métodos de extração de DNA total do leite.....	18
4.2. Limite de detecção de <i>P. fluorescens</i> em leite por PCR .....	24

4.3. Avaliação do método de detecção de <i>P. fluorescens</i> por PCR para análise de leite cru.....	25
3.5. Avaliação da proteólise da caseína das amostras de leite cru .....	32
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## RESUMO

MACHADO, Solimar Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Detecção de *Pseudomonas fluorescens* em leite cru pela reação em cadeia da polimerase.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadoras: Denise Mara Soares Bazzolli e Elza Fernandes de Araújo.

Entre os micro-organismos psicotróficos que são capazes de crescer durante a refrigeração, alguns produzem proteases termorresistentes relacionadas com problemas tecnológicos nos derivados lácteos. Visto que a demanda por métodos que permitem alta taxa de processamento exigida em indústrias de alimentos para controle da qualidade de leite cru é crescente, a avaliação de métodos mais sensíveis e mais rápidos para detecção de psicotróficos, especialmente *Pseudomonas fluorescens*, espécie predominante, é de grande importância. Com a finalidade de estabelecer um protocolo para detecção de *P. fluorescens* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), foram avaliados cinco métodos de extração de DNA total do leite, dois genes alvos na PCR e o limite de detecção dos métodos para análise de leite cru e leite esterilizado e inoculado com *P. fluorescens*. O kit comercial e o método de filtração modificado foram os métodos mais adequados para extração de DNA total de amostras de leite, por isso, foram utilizados nas análises seguintes para detecção dos genes alvos. No entanto, a utilização do método de filtração modificado para análise de leite inoculado com *P. fluorescens* e leite cru resultou em um menor limite de detecção quando comparado com o kit comercial. Por meio da amplificação do gene alvo rDNA 16S, foi possível observar um amplificado de 850 pb quando a

população do leite inoculado com *P. fluorescens* era da ordem de  $10^2$  UFC/ml. Em amostras de leite cru, foi possível detectar o produto quando a contagem de *Pseudomonas* era da ordem de  $10^6$  UFC/ml e a população de psicotróficos estava entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC/ml. A análise do grau de proteólise das amostras de leite cru por eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou que a relação entre a população de psicotróficos e a degradação das proteínas do leite depende de outros fatores além da contagem de psicotróficos.

## ABSTRACT

MACHADO, Solimar Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2011. **Detection of *Pseudomonas fluorescens* in raw milk by the polymerase chain reaction.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Elza Fernandes de Araújo.

Among the psychrotrophic micro-organisms that are able to grow during refrigeration, some of them produce thermostable proteases which can cause many technological problems in the dairy industry. The food industries need to high throughput methods for the quality control raw of milk, thus, fast and sensitive methods for psychrotrophic detection, specially *Pseudomonas fluorescens*, predominant specie, are economically interesting to the dairy industry. In order to establish a protocol for the detection of *P. fluorescens* by using the polymerase chain reaction (PCR), five DNA extraction methods for milk samples, two target genes for the PCR amplification and the detection limit in raw milk and sterilized milk inoculated with *P. fluorescens* were evaluated. A commercial DNA extraction kit and a modified filtration method were the most appropriate for successfully bacterial DNA extraction from milk samples. These methods were selected and used for the detection of the target genes. Nevertheless, the modified filtration method was more efficient showing a lower detection limit in raw milk and sterilized milk inoculated with *P. fluorescens*. By means of PCR amplification of the 16S rRNA target gene, an 850 bp amplicon was observed and it was possible to detect as few as  $10^2$  UFC/ml of *P. fluorescens* from inoculated milk. In raw milk samples, *Pseudomonas* and psychrotrophic bacteria were detected at  $10^6$  UFC/mL and  $10^7$  to  $10^9$  UFC/mL, respectively. The relationship between the psychrotrophic population and the

degradation of milk proteins was evaluated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed the proteolysis degree in raw milk doesn't depend just on the psychrotrophic bacteria count.

## 1. INTRODUÇÃO

A legislação brasileira estabelece que o leite cru deve ser refrigerado na propriedade rural para evitar a deterioração por micro-organismos mesófilos. Entretanto, a manutenção do leite cru sob refrigeração, por períodos prolongados, favorece a seleção de micro-organismos psicotróficos. A maioria das bactérias psicotróficas são inativadas no processo de pasteurização, mas muitas produzem proteases termorresistentes que degradam as proteínas do leite. A atividade das proteases resulta em alguns problemas tecnológicos como a gelificação do leite UHT, instabilidade térmica do leite, sabor indesejável em alguns produtos lácteos e redução do rendimento na fabricação de queijos.

Considerando que o controle de micro-organismos psicotróficos tem grande importância na cadeia produtiva do leite, o método convencional utilizado para contagem de psicotróficos pelas indústrias baseia-se no plaqueamento em ágar PCA e na incubação à 7 °C por 7 a 10 dias. No entanto, este método é demorado e não permite uma avaliação rápida do potencial de deterioração do leite cru analisado.

Outros métodos alternativos para determinação da microbiota contaminante deterioradora e/ou patogênica do leite já foram avaliados. Entre essas técnicas, a reação da polimerase em cadeia (PCR) tem sido usada como ferramenta para monitorar a qualidade microbiológica de alimentos pela rapidez, precisão e sensibilidade. No entanto, o leite é uma matriz complexa que apresenta na sua composição diversos interferentes dessa técnica o que pode prejudicar o resultado da análise. Além disso, o leite cru tem uma microbiota diversa que pode interferir na

preparação do DNA e na amplificação dos genes alvo. Essas limitações do método podem diminuir a sensibilidade e o potencial de utilização da técnica.

Em diversos estudos fundamentados em técnicas convencionais e moleculares têm demonstrado que *P. fluorescens* é a espécie psicrotrófica proteolítica predominantemente encontrada em leite cru refrigerado e que a técnica de PCR é uma ferramenta importante para o monitoramento da qualidade do leite cru.

Os objetivos desse estudo foram avaliar métodos de métodos de extração de DNA total e genes alvo para amplificação a fim de aumentar a sensibilidade da técnica de PCR para detecção de *P. fluorescens* em leite cru e demonstrar que o método desenvolvido pode ser utilizado para monitorar a qualidade de leite cru refrigerado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Impacto da refrigeração na dinâmica da população microbiana do leite cru

A estocagem do leite recém-ordenhado sob baixas temperaturas foi implementada no Brasil na segunda metade da década de 90 para minimizar a deterioração por micro-organismos mesófilos. Segundo a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em vigor a partir de 01 de julho de 2005, o leite deve ser armazenado a uma temperatura igual ou inferior a 4 °C em tanque de expansão direta ou a uma temperatura limite de 7 °C em tanque de imersão, até um tempo máximo de 3 horas após a ordenha (Brasil, 2002). Além disso, esta mesma lei estabelece que o transporte do leite até o estabelecimento industrial deve ser feito em carro com tanque isotérmico, a temperatura máxima de 10 °C, em um intervalo de tempo máximo de 48 horas após a ordenha. No entanto, a manutenção do leite à temperatura igual ou inferior a 7 °C não impede a multiplicação de bactérias psicrófilas que podem crescer em temperaturas mínimas entre 0 °C e 7 °C (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

Segundo os estudos que utilizam métodos convencionais de cultivo para monitorar a comunidade bacteriana do leite cru, os principais micro-organismos psicrófilos encontrados são representados pelos gêneros gram-negativos *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp. e pelos gram-positivos *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e

*Micrococcus* spp. (Munsch-Alatossava e Alatossava, 2006; Pinto, 2004; Sørhaug e Stepaniak, 1997).

Pinto (2004) constatou que 84,6 % das bactérias psicrotróficas proteolíticas identificadas e isoladas de leite cru refrigerado são gram-negativas. Dentro desse grupo, o gênero *Pseudomonas* representou o maior percentual do total de bactérias identificadas (33,98 %), sendo a espécie *P. fluorescens* predominante. Arcuri et al. (2008) também demonstraram que 43 % dos isolados de leite cru refrigerado pertenciam ao gênero *Pseudomonas*, sendo *P. fluorescens* a espécie predominante, seguida de *Acinetobacter* spp. e *Aeromonas hydrophila*.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* contêm de 59 a 72% de lipídeos insaturados na membrana celular, o que lhes confere maior versatilidade em relação à maioria dos micro-organismos que aumentam a síntese de ácidos graxos insaturados quando cultivados a baixas temperaturas para manter o lipídeo em estado líquido, permitindo que a membrana continue exercendo sua atividade. Além da modificação na membrana celular, é necessária uma adaptação da estrutura da enzima para que ela possa manter sua capacidade catalítica eficiente e a síntese de proteínas, denominadas de Proteínas do Choque Frio, que são proteínas envolvidas na estrutura do mRNA, na síntese de proteína e, ou, proteção ao congelamento (Jay, 2005).

Os resultados obtidos na análise microbiológica do leite por métodos convencionais foram confirmados quando técnicas moleculares foram utilizadas. Hantis-Zacharov e Halpern (2007) identificaram os isolados psicrotróficos predominantes em leite cru pelo sequenciamento do gene rRNA 16S e constataram que esses isolados pertenciam a três classes, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, e *Actinobacteria*, sendo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Microbacterium* os gêneros dominantes. A mesma técnica foi utilizada por Ercolini et al. (2009) para identificação dos principais contaminantes de leite cru. Esses autores revelaram que espécies do gênero *Pseudomonas* eram predominantes, seguidas de espécies da família Enterobacteriaceae como *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii*.

Rasolofu et al. (2010) analisaram a dinâmica da população microbiana de leite cru, após 7 dias de estocagem a 4 °C, pela técnica de PCR quantitativo (qPCR) e constataram que o gênero *Pseudomonas* representava 94,2 % da microbiota. Esses

autores construíram uma biblioteca de clones na qual a espécie *P. fluorescens* representava 20,3 %.

Análises da biodiversidade da microbiota em leite cru refrigerado por 24 e 48 h pela técnica de electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) revelaram um perfil genético complexo, composto por muitas bandas correspondentes a uma grande variedade de populações bacterianas (Raats et al., 2011). Nesse estudo, as bandas dominantes nas amostras analisadas imediatamente após a ordenha e após 24 h de refrigeração correspondiam ao filo *Firmicutes*. No entanto, houve uma mudança significativa na composição da comunidade bacteriana após 48 horas de refrigeração uma vez que as bandas correspondentes ao filo *Proteobacteria* se tornaram visíveis. As análises da biblioteca de clones mostraram que os gêneros mais abundantes encontrados nas amostras após incubação sob refrigeração eram *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (Raats et al., 2011).

De Jonghe et al. (2011) demonstraram que *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. lundensis* e *P. fragi* dominavam a microbiota do leite cru refrigerado, apesar do gênero *Acinetobacter* ter sido detectado no perfil de DGGE após 4 dias de estocagem a 3,5 °C. Esses autores isolaram novas espécies do gênero *Pseudomonas* quando o leite foi estocado a 6 °C o que indicou que condições abusivas favorecem a maior diversidade da microbiota pertencente a esse gênero.

O gênero *Pseudomonas* é o principal produtor de proteases termorresistentes no leite cru refrigerado, sendo *P. fluorescens* um micro-organismo deteriorador de grande importância (Marchand et al., 2008; Sørhaug e Stepaniak, 1997). Segundo Dogan e Boor (2003), 67 % dos isolados de indústrias de laticínios pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são produtores de lipases e 51 %, produtores de protease. (Stulova et al., 2010) também demonstraram que 66,7 % dos isolados psicrotóxicos de leite cru apresentavam atividade proteolítica à 7 °C. A atividade proteolítica e lipolítica estão frequentemente associadas em bactérias gram-negativas não fermentadoras de glicose, grupo no qual se encontram as espécies de *Pseudomonas* (Pinto, 2004).

## 2.2. Proteases produzidas por *P. fluorescens*

As enzimas proteolíticas produzidas por bactérias psicrotróficas permanecem ativas após pasteurização e esterilização comercial e podem degradar as proteínas do leite durante estocagem embora esses micro-organismos sejam inativados por processos térmicos (Chen et al., 2003; Nicodème et al., 2005). Uma vez presentes no leite, essas enzimas não podem ser completamente inativadas sem causar danos ao produto. Segundo Marchand et al. (2008), 75 % das proteases termorresistentes permanecem ativas no leite após tratamento térmico de 8,45 minutos a 95 °C.

As proteases produzidas por *P. fluorescens* são metaloenzimas que dependem de íons divalentes para sua atividade e estabilidade. Martins (2007) demonstrou que essas enzimas têm atividade máxima quando íons  $\text{Ca}^{+2}$  são adicionados na solução e que são inibidas na presença de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), quelante de íons divalentes. No entanto, a atividade dessas proteases não é afetada pela presença de inibidores de serino proteases como leupeptina ou fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Dufour et al., 2008).

A metaloprotease de *P. fluorescens* é codificada pelo gene *aprX* localizado no operon *aprX lipA* (McCARTHY et al., 2004). Os genes que codificam a metaloprotease (*aprX*) e a lipase (*lipA*) são localizados em extremidades opostas do operon que também inclui inibidores de proteases (gene *inh*), sistema de secreção Tipo I (genes *aprDEF*) e serino proteases autosssecretadas (genes *prtA* e *prtB*). No entanto, a organização do operon varia entre as estirpes (WOODS et al., 2001). Dufour et al. (2008) verificaram que o gene *aprX* foi expresso durante as fases exponencial, de transição e estacionária de crescimento de três estirpes de *P. fluorescens* apesar do potencial caseinolítico ter sido detectado apenas na fase estacionária. Os autores sugeriram que o gene *aprX* pode ser regulado ao nível da tradução ou pode ser expresso e traduzido em quantidade pequena nas fases exponencial e de transição o que impediu a detecção do potencial caseinolítico.

As proteases termorresistentes hidrolisam todos os tipos de caseína, com preferência pela  $\kappa$ -caseína conforme demonstrado por Pinto (2004). Esse autor avaliou o efeito dessas enzimas sobre as frações de caseína do leite por eletroforese em gel de poliacrilamida e observou a hidrólise completa da caseína de leite inoculado com um isolado de *P. fluorescens* após 48 h de estocagem a 10 °C.

A hidrólise da  $\kappa$ -caseína pode ser responsável pela desestabilização das micelas de caseína e produção de peptídeos pequenos hidrossolúveis, que são liberados no soro ao invés de formarem parte do coágulo, e assim o rendimento de queijos é reduzido (Nielsen, 2002). Cardoso (2006) demonstrou que o crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru armazenado a 10 °C por quatro dias reduziu o rendimento do queijo Minas Frescal em 6,78 %. As perdas financeiras decorrentes da redução do rendimento foram estimadas em US\$ 15 480 por mês para uma indústria de médio porte. Além disso, essas enzimas podem ser responsáveis por problemas tecnológicos em produtos de vida útil longa como a gelificação do leite UHT (“ultra-alta temperatura”) e o desenvolvimento de sabores indesejáveis em leite em pó (Celestino et al., 1997).

### **2.3. Métodos de detecção de micro-organismos psicrotróficos em leite**

Para evitar os problemas causados por proteases de psicrotróficos, a rápida detecção da presença desses contaminantes no leite cru, em particular *P. fluorescens*, é de grande importância. O procedimento de contagem padrão em placas é frequentemente empregado para detecção de contaminação por psicrotróficos no leite e em produtos lácteos em geral. Entretanto, esse método demanda tempo e não permite uma avaliação rápida do potencial de deterioração do leite por psicrotróficos (Dufour et al., 2008).

Métodos alternativos são avaliados quanto ao potencial para detecção de micro-organismos patogênicos e/ou deterioradores em alimentos (Vanetti, 2009). A Federação Internacional de Laticínios (FIL) publicou em 1991 um método oficial para contagem de micro-organismos psicrotróficos em leite no qual se estabeleceu a contagem das colônias em placas após dez dias de incubação a 6,5 °C (IDF, 1991a). Uma variação desse método para contagem de psicrotróficos preconiza a incubação das placas a 21 °C por 25 horas (IDF, 1991b).

A produção de anti-soro contra proteases de micro-organismos psicrotróficos foi utilizada para desenvolver uma metodologia de resultados rápidos com o objetivo de caracterizar a qualidade de leite (Dupont et al., 2007; Machado, 2006; Matta et al., 1997). Machado (2006) aplicou a técnica da aglutinação em gotas e de imunodot-blot para detecção de *P. fluorescens* inoculada em leite desnatado reconstituído 12 %. Foi

possível detectar células de *P. fluorescens* em concentrações de  $10^3$  e  $10^5$  UFC/ml pelas técnicas de aglutinação em gotas e de imunodot-blot, respectivamente (Machado, 2006).

No entanto, não seria possível produzir anti-soros contra todas as proteases de *P. fluorescens* visto que os isolados dessa espécie apresentam considerável diversidade genética. A ribotipagem realizada por Dogan e Boor (2003) revelou 42 ribotipos diferentes quando 81 isolados de leite cru e de leite pasteurizado pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram analisados. Segundo Martins et al. (2006) alguns isolados de *P. fluorescens* provenientes de leite cru refrigerado apresentam grande distância genética baseada na técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD). Além disso, Marchand et al. (2009b) analisaram o grau de conservação das proteases entre os isolados de leite pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e observaram alto nível de heterogeneidade entre as sequências parciais dos genes codificadores e entre as sequências de aminoácidos dessas proteínas, o que confirma a diversidade de proteases produzidas por *Pseudomonas* spp.

A microbiologia molecular aplicada tem evoluído rapidamente e os métodos têm se tornado um valioso suporte para as técnicas tradicionais de identificação e monitoramento de micro-organismos (Ercolini et al., 2004). A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode detectar espécies microbianas e a sensibilidade facilita a detecção de uma população baixa de micro-organismos. No entanto, a detecção de micro-organismos por PCR em alimentos é limitada pela presença de substâncias que reduzem a eficiência da amplificação do fragmento de DNA (Lantz et al., 2000).

Estratégias rápidas para detecção de *P. fluorescens* por PCR têm sido objeto de estudo. A amplificação do rDNA 16S correspondente a um fragmento de 850 pb utilizando os oligonucleotídeos específicos foi proposto por Scarpellini et al. (2004) para identificar biotipos de *P. fluorescens*. As regiões alvo dos oligonucleotídeos 16PSEfluF e 16SPSER foram encontradas em todas as estirpes de referência de *P. fluorescens* investigadas.

A amplificação do gene *aprX* que codifica uma metaloprotease foi sugerido por Martins et al. (2005) para detecção de psicrotróficos proteolíticos em leite. O gene *aprX* de *P. fluorescens* 041 apresentou 97 % de identidade com as sequências do mesmo gene de outros isolados de *P. fluorescens* depositadas no GenBank

(Martins, 2007). A alta identidade com as sequências de enzimas homólogas demonstram o potencial destes genes para serem usados como marcadores para detecção de psicrotróficos em leite cru usando a PCR como foi descrito por Martins et al. (2005).

Martins et al. (2005) detectaram o gene *apr* em *Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *Serratia marcescens*, bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite. Nesse mesmo estudo, foi possível detectar uma população de  $10^5$  UFC/ml de *P. fluorescens* quando leite em pó desnatado reconstituído inoculado com essa espécie foi avaliado quanto à presença do gene *apr*. A sensibilidade do método foi menor quando as amostras de leite pasteurizado inoculadas com *P. fluorescens* foram submetidas à amplificação sem extração e purificação do DNA. Nesse caso, contagens maiores que  $1,7 \times 10^8$  UFC/ml foram necessárias para visualização do produto da amplificação do gene *apr* (Martins et al., 2005). Alguns estudos já demonstraram que quando a população de *P. fluorescens* atinge  $10^8$  UFC/ml a qualidade do leite já está comprometida devido à proteólise (Pinto, 2004; Pinto, 2005). A análise sensorial de leite cru incubado a  $7^\circ\text{C}$  demonstrou que o sabor amargo, problema tecnológico resultante da atividade de proteases, foi percebido a partir do quinto dia de incubação quando a população atingiu  $10^6$  UFC/ml (Kumaresan et al., 2007).

Segundo Marchand et al. (2009b), a baixa sensibilidade obtida nos estudos desenvolvidos por Martins et al. (2005) deve-se ao fato de que apenas uma pequena parte do gene *aprX*, constituída de 194 pb, foi amplificada. Esses autores analisaram a amplificação do mesmo gene utilizando os oligonucleotídeos SM2F e SM3R, com um produto de amplificação de 800 pb como uma alternativa para aumentar a sensibilidade do método proposto por Martins et al. (2005). O produto de PCR foi facilmente detectado em leite reconstituído inoculado com  $2,1 \times 10^3$  UFC/ml a  $1,2 \times 10^8$  UFC/ml de *P. fluorescens* após extração de DNA com um kit comercial. Apesar desse método também ter sido eficiente para detecção *P. fluorescens* na presença de outras bactérias contaminantes, houve uma redução da sensibilidade e foi possível a detecção do produto de PCR quando a população de *P. fluorescens* foi de até  $10^4$  UFC/ml em leite com  $10^6$  UFC/ml de outras bactérias contaminantes (Marchand et al., 2009b).

## 2.4. Métodos de extração de DNA total para análise de leite cru

A sensibilidade da técnica de PCR para muitas amostras pode ser afetada pela presença de substâncias inibidoras presentes no leite como  $\text{Ca}^{+2}$ , gordura e proteínas que afetam a reação (Dufour et al., 2008). Para aumentar a sensibilidade, é necessário otimizar os processos de extração de DNA a partir do leite para eliminar as substâncias inibidoras.

Wu e Kado (2004) desenvolveram uma estratégia para aumentar a sensibilidade do método de detecção de bactérias em leite por PCR. Esses autores sugeriram um método de enriquecimento seguido por uma etapa de filtração para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 de amostras de leite por PCR e o limite de detecção foi de  $10^2$  UFC/ml. O tempo entre a coleta da amostra de leite para enriquecimento e visualização do resultado da eletroforese foi inferior a 8 h.

Na tentativa de aumentar a sensibilidade do método de PCR para detecção de bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* em amostras de leite, Cremonesi et al. (2006) desenvolveram um método rápido para extração de DNA. Esse método baseia-se na capacidade da sílica se ligar ao DNA na presença de altas concentrações de tiocianato de guanidina, o que garante excelente ruptura das células bacterianas. O processamento da amostra pelo método proposto requer, no mínimo, 6 h para extração do DNA, amplificação por PCR e visualização do resultado por eletroforese.

Pirondini et al. (2010) compararam seis métodos, comerciais e não comerciais, para extração de DNA total de diferentes produtos lácteos. O método baseado na utilização de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) apresentou os melhores resultados. Além disso, os resultados desse estudo demonstraram que a presença de inibidores de PCR na solução pode influenciar os resultados obtidos por qPCR.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DMB) e no Laboratório de Genética Molecular e de Micro-organismos (DMB) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

#### **3.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo**

As linhagens referência *P. fluorescens* ATCC 13525 ou *Escherichia coli* ATCC 29214 foram cultivadas em caldo Luria Bertani - LB (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l e NaCl 10 g/l) por 18 h a 25°C e 37 °C, respectivamente.

O estoque das culturas foi feito em caldo LB, contendo 20 % de glicerol esterilizado e congelado a -20 °C. Antes de cada experimento, as células foram reativadas por duas semeaduras consecutivas em caldo LB.

#### **3.2. Métodos de extração de DNA total de leite**

Três amostras de 150 ml de leite cru, provenientes de propriedades rurais diferentes e estocadas sob refrigeração por 48 h, foram coletadas em frascos de vidro esterilizados e transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas com gelo.

Duas alíquotas de 50 ml de cada amostra foram esterilizadas a 121 °C por 15 min e inoculadas separadamente com *P. fluorescens* ATCC 13525 e *E. coli* ATCC

29214 com uma população aproximada de  $10^5$  UFC/ml. As alíquotas foram incubadas sob agitação de 150 rpm por 12 h a 25 °C quando inoculadas com *P. fluorescens* e a 37 °C quando inoculadas com *E. coli*. Outra alíquota de leite cru (50 ml) foi mantida sob refrigeração para a extração de DNA total. O leite inoculado com *E. coli* ATCC 29214 foi utilizado como controle negativo.

Foram avaliados cinco protocolos (Tabela 1) para extração de DNA das amostras de leite, inoculadas ou não. As extrações de DNA total foram realizadas utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA), o método com sílica com uma ou duas eluições (Cremonesi et al., 2006), o método de filtração (Wu e Kado, 2004), o método de filtração modificado e o método com utilização de brometo de cetil trimetil amônio – CTAB (Pirondini et al., 2010).

Tabela 1 – Métodos para extração de DNA total de amostras de leite.

<b>Métodos</b>	<b>Princípios dos Métodos</b>
Kit Wizard <sup>®</sup> - S	Kit comercial com protocolo para extração de DNA total de amostras de sangue
Sílica	DNA se liga à sílica e é purificado após sucessivas etapas de lavagem
Filtração	Etapas de enriquecimento seguida de filtração
Filtração modificado	Etapas de enriquecimento e filtração seguidas de purificação com o kit Wizard <sup>®</sup> utilizando protocolo para extração de DNA total de bactérias gram-negativas
CTAB	Cetil trimetil amônio utilizado para favorecer a lise celular

A modificação no método de filtração constituiu de um período de incubação de 6 h do caldo LB inoculado com as amostras de leite. As amostras inoculadas com *P. fluorescens* e o leite cru foram incubados a 25 °C e as amostras de leite inoculadas com *E. coli* foram incubadas a 37 °C. A membrana foi lavada com 1 ml de solução salina (NaCl 0,9 g/l) e os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 30 min. A suspensão de células foi submetida à extração de DNA total utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para extração de DNA total de bactérias gram-negativas (kit Wizard<sup>®</sup>-GN).

Com o objetivo de se obter maior eficiência da extração de DNA total, foi avaliado o volume de leite cru utilizado na etapa de enriquecimento do método de filtração modificado. Alíquotas de 100 µl, 1 ml e 10 ml de uma amostra de leite cru estocado em tanque de expansão por 48 h foram inoculadas em 100 ml de caldo LB. Além disso, alíquotas de 100 µl, 1 ml e 10 ml dessa mesma amostra de leite cru foram centrifugadas a 2200 g por 10 min em centrífuga Sorvall RC5C (Du Pont, EUA). O sobrenadante foi descartado e as células inoculadas em 100 ml de caldo LB. Após incubação a 25 °C sob agitação de 150 rpm por 6 h, alíquotas de 10 ml do meio de cultura enriquecido foram filtradas e submetidas à extração de DNA total como descrito anteriormente.

A qualidade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. A eficiência das extrações foi avaliada pela quantificação em espectrofotômetro Ultrospec<sup>®</sup> 3000 (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) a partir da relação  $A_{260}/A_{280}$  e da concentração em ng/µl.

Todos os métodos testados também foram avaliados quanto à presença de inibidores pela técnica de PCR com os oligonucleotídeos específicos, 16SPSEfluF e 16SPSER, para amplificação de rDNA 16S de *P. fluorescens* (Scarpellini et al., 2004). As amplificações foram realizadas em reações com volume final de 50 µl contendo 20 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs, 1,25 U de GoTaq<sup>®</sup> DNA polimerase, 10 µl de tampão 5X, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo e 0,10 mg/ml de BSA. Os reagentes utilizados foram adquiridos da Promega (Madison, EUA). A PCR foi realizada em termociclador PTC-100<sup>™</sup> (MJ Research, Inc., Watertown, EUA) com o seguinte programa: desnaturação inicial, a 94 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 40 s e 72 °C por 1 min; a extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min. Uma mistura de reação, contendo água para substituir o volume de DNA, foi utilizada como controle negativo.

O produto de PCR foi separado em gel de agarose 1,5 % em tampão para eletroforese Tris-borato/EDTA (TBE) (Tris-HCl 89 mM, EDTA pH 8,0 2,5 mM, borato 89 mM) e corado com brometo de etídeo (0,2 µg/ml). O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o sistema de vídeo Eagle-Eye II (Stratagene, La Jolla, EUA).

### 3.3. Genes alvo utilizados para detecção de *P. fluorescens* em leite por PCR

Para avaliar o limite de detecção da técnica de PCR utilizando três pares de oligonucleotídeos diferentes (Tabela 2), uma amostra de 500 ml de leite cru foi coletada imediatamente após ordenha no estábulo da Universidade Federal de Viçosa e esterilizada a 121 °C por 15 min. Células de *P. fluorescens* foram inoculadas em 30 ml de leite esterilizado na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/ml. Após 24 h de incubação a 25 °C sob agitação de 150 rpm, foram feitas diluições sucessivas em leite esterilizado para obter contagens de, aproximadamente, 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/ml. O número de células viáveis de *P. fluorescens* nas amostras de leite esterilizado e inoculado foi determinado pelo método de microgotas (Swanson et al., 2001) em Ágar padrão para contagem (PCA), em duplicata, após incubação a 25 °C por 24 h.

A extração de DNA total das amostras de leite contaminadas com número conhecido de células de *P. fluorescens* foi realizada pelo kit Wizard<sup>®</sup>-S e pelo método de filtração modificado utilizando como inóculo 1 ml da amostra de leite como descrito no item 3.2. A reação de PCR foi realizada com cada um dos oligonucleotídeos listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados na PCR para detecção de *P. fluorescens* em leite cru.

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>aprX</i>	FP aprI	5'-TAYGGBTTCAAYTCCAAYAC-3'	194	(Bach et al., 2001)
	RP aprII	5'-VGCGATSGAMACRTRCC-3'		
<i>aprX</i>	SM2F	5'-AAATCGATAGCTTCAGCCAT-3'	900	(Marchand et al., 2009b)
	SM3R	5'-TTGAGGTTGATCTTCTGGTT-3'		
rDNA	16SPSEfluF	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	850	(Scarpellini et al., 2004)
16S	16SPSER	5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'		

Os oligonucleotídeos degenerados FP aprI/RP aprII amplificam o gene *apr* em *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e *Serratia marcescens* (Martins et al. 2005) enquanto os oligonucleotídeos SM2F/SM3R, que amplificam um fragmento maior do mesmo gene, são específicos para *P. fragi* e *P. fluorescens* (Marchand et al., 2009b). Já os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER são espécie específicos e amplificam rDNA 16S de *P. fluorescens* (Scarpellini et al., 2004).

A mistura de reação assim como a amplificação foi realizada como descrito no item 3.2., quando os pares de oligonucleotídeos SM2F/SM3R e 16SPSEfluF/16SPSER foram utilizados. Para avaliar o par FP aprI/RP aprII, a reação foi realizada com o volume final de 50 µl contendo 20 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs, 1,25 U de GoTaq<sup>®</sup> DNA polimerase, 10 µl de tampão 5X, 0,5 mM de cada oligonucleotídeo e 0,10 mg/ml de BSA. Os reagentes utilizados foram adquiridos da Promega (Madison, EUA). O seguinte programa foi utilizado: desnaturação inicial, a 94 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s; a extensão final foi realizada a 72 °C por 10 min.

Uma mistura de reação sem DNA foi utilizada como controle negativo. O produto de PCR foi separado em gel de agarose 1,5 % quando os oligonucleotídeos SM2F/SM3R e 16SPSEfluF/16SPSER foram utilizados e 2% quando FP aprI/RP aprII foi utilizado. A eletroforese foi realizada em tampão TBE e corada com brometo de etídeo como descrito no item 3.2. O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o sistema de vídeo Eagle-Eye II (Stratagene, La Jolla, EUA).

#### **3.4. Avaliação do método de detecção de *P. fluorescens* por PCR para análise de leite cru**

Com a finalidade de validar o protocolo para detecção de *P. fluorescens* por PCR, três amostras de leite cru foram coletadas no estábulo do departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O leite cru destinado à fabricação do leite pasteurizado tipo B foi coletado imediatamente após a ordenha em uma válvula localizada na tubulação que antecede o tanque de refrigeração. As amostras foram transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas com gelo e incubadas a 7 °C por 10 dias. As três amostras foram coletadas em dias diferentes e cada uma delas corresponde a uma réplica biológica.

Periodicamente, ao longo de 10 dias, cada uma das três amostras de leite cru, foi avaliada quanto à população de psicotróficos, de psicotróficos proteolíticos e de *Pseudomonas*. Além disso, o pH das amostras foi determinado com o pHmetro Tecnoport MPA-210P (São Paulo, Brasil).

Para contagem de psicotróficos, diluições decimais em salina peptonada (NaCl 0,85 % e peptona 0,1 %) das amostras de leite cru foram plaqueadas, em

duplicata, em PCA e as placas incubadas a 7 °C por 7 dias. Nas repetições II e III, foi realizada a contagem de psicotróficos proteolíticos, em duplicata, em PCA suplementado de 2 % de leite em pó desnatado. A contagem das colônias com halo de proteólise foi realizada após 10 dias de incubação a 7 °C. Além disso, diluições seriadas das amostras foram plaqueadas, em duplicata, em Ágar Base para *Pseudomonas* (Ágar CFC) modificado por Pinto (2004) com adição de lactose 10 g/l, azul de bromotimol 0,02 g/l e suplemento seletivo CFC (cetrimida 10 mg/l, fucidina 10 mg/l e cefalosporina 50 mg/l) (HiMedia, Mumbai, Índia). As colônias típicas do gênero *Pseudomonas* que apresentaram coloração esverdeada com halo azulado foram contadas após 48 h de incubação a 25 °C. Uma colônia com características típicas do gênero *Pseudomonas* de cada uma das repetições foi purificada e identificada pelo kit RapID™ NF Plus (Remel, Kansas, EUA).

A amostra de leite cru da repetição II foi analisada quanto à população de bactérias lácticas após oito dias de incubação. Diluições sucessivas da amostra foram plaqueadas em ágar MRS (Acumedia Manufacturers, Inc., Michigan, EUA) e as placas foram incubadas em microaerofilia a 30 °C por 48 h.

A cada tempo de análise microbiológica, amostras de leite cru refrigerado foram também submetidas à extração de DNA total, pelo método kit Wizard®-S e pelo método de filtração modificado como descrito no item 3.2. A reação de PCR com os oligonucleotídeos SM2F/SM3R e 16SPSEfluF/16SPSER, o programa utilizado e a análise do produto da reação estão descritos no item 3.2.

### **3.5. Avaliação da proteólise da caseína das amostras de leite cru**

Além disso, o efeito da atividade de micro-organismos psicotróficos proteolíticos na degradação da caseína foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida realizada segundo (Laemmli, 1970) com modificações, em Sistema Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad, EUA).

Para preparação das amostras de caseína, alíquotas de 10 ml do leite cru refrigerado foram acidificadas para pH 4,0 com ácido clorídrico 1 mol/l, sob agitação constante para precipitação da caseína. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9000 g, por 10 min em centrífuga Sorval RC5C (Du Pont, EUA). O soro foi eliminado e o volume original foi reconstituído com tampão Tris-HCl 100

mM, corrigindo-se o pH para 6,9. As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl (pH 6,9) 100 mM na proporção 1:100. As diluições foram quantificadas quanto à concentração de proteínas pelo método de Warburg-Christian (Cooper, 1977). Alíquotas contendo, aproximadamente, 10 µg de proteína, foram adicionadas à solução de tampão de amostra e submetidas a tratamento térmico por imersão em banho de água fervente, por 10 min e, posteriormente, analisadas.

Foram utilizados géis de poliacrilamida contendo SDS de acordo com sistema descontínuo utilizando-se, para a separação das proteínas, um gel de acrilamida a 15% e o gel de empilhamento a 5,0 %. Os géis foram polimerizados quimicamente, pela adição de 0,18 % (v/v) de tetrametileno diamina (TEMED) e 0,05 % (p/v) de persulfato de amônio. O tampão de corrida do catodo colocado entre as placas, continha Tris-base (0,1 M), tricina (0,1 M) e SDS (0,1 %). O tampão do anodo, pH 8,9, era constituído de Tris-base (0,2 M).

A eletroforese foi conduzida a 60 V por 30 min, para empilhamento e 80 V, por 2 h, para separação das frações protéicas. Os géis foram fixados e corados, por 2 h, à temperatura ambiente, em solução de azul de Coomassie (metanol 50 %, azul de Coomassie 0,05 %, ácido acético 10 % e H<sub>2</sub>O 40 %).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação dos métodos de extração de DNA total do leite

A concentração de DNA extraído de amostras de leite cru contaminadas ou não com *E. coli* ou *P. fluorescens* foi avaliada por espectrofotometria. No entanto, a concentração de DNA íntegro nas amostras, quando analisada por eletroforese em gel de agarose (Figura 1), não correspondeu àquela estimada por espectrofotometria a 260 nm (Tabela 3). Esta diferença pode estar relacionada à complexidade da matriz de leite que apresenta interferentes como lipídeos e proteínas e à presença de moléculas como nucleotídeos livres, oligonucleotídeos e ácidos nucléicos de fita simples (RNA), que podem interferir na leitura da absorvância, pois essas moléculas também absorvem luz no mesmo comprimento de onda (Pirondini et al., 2010; Sambrook e Russel, 2001). Segundo Sambrook e Russell (2001), o método de análise da integridade de DNA dupla fita mais adequado para amostras contaminadas é eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo uma vez que este composto intercala entre as bases da mesma fita de DNA. Embora a eletroforese em gel de agarose seja um método menos sensível, nucleotídeos livres, proteínas e compostos aromáticos não interferem na quantificação, o que permite uma análise mais exata.

Tabela 3 – Avaliação da concentração e qualidade de DNA total obtido com métodos comerciais e não-comerciais.

	Método de Extração	Concentração de DNA total <sup>a</sup> (ng/μl) A <sub>260</sub>	Razão <sup>b</sup> A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	Intensidade		
				da banda em gel de agarose <sup>b</sup>	PCR <sup>c</sup> (+/total)	
<b>Leite inoculado com <i>E. coli</i></b>	Sílica	1 <sup>a</sup> eluição	211,7 ± 10,6	1,78	[+ +]	0/3
		2 <sup>a</sup> eluição	109,2 ± 4,4	1,75	[+]	0/3
	Filtração	3460,0 ± 425,2	1,72	[+ +]	0/3	
	Filtração modificado	230,8 ± 108,0	1,92	[+ +]	0/3	
	Kit Wizard <sup>®</sup> -S	10,7 ± 0,3	1,93	[+]	0/3	
	CTAB <sup>e</sup>	58,3 ± 12,4	1,53	[+]	0/3	
<b>Leite inoculado com <i>P. fluorescens</i></b>	Sílica	1 <sup>a</sup> eluição	95,8 ± 6,5	1,6	[+]	0/3
		2 <sup>a</sup> eluição	46,7 ± 3,6	1,7	[+]	0/3
	Filtração	1267,0 ± 537,8	1,5	[+]	0/3	
	Filtração modificado	44,7 ± 9,8	2,0	[+ +]	3/3	
	Kit Wizard <sup>®</sup> -S	5,7 ± 0,3	Nd <sup>d</sup>	[+]	3/3	
	CTAB <sup>e</sup>	91,7 ± 11,8	1,7	[+]	1/3	
<b>Leite cru</b>	Sílica	1 <sup>a</sup> eluição	31,7 ± 0,8	1,4	[+]	0/3
		2 <sup>a</sup> eluição	14,5 ± 0,5	1,4	[+]	0/3
	Filtração	976,7 ± 138,0	1,5	[-]	0/3	
	Filtração modificado	6,3 ± 0,6	Nd <sup>d</sup>	[+]	2/3	
	Kit Wizard <sup>®</sup> -S	6,0 ± 1,4	Nd <sup>d</sup>	[+]	3/3	
	CTAB <sup>e</sup>	27,5 ± 12,9	1,4	[+]	2/3	

<sup>a</sup> O DNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria e expresso em ng/μl (média ± erro padrão). As médias e os erros padrão foram calculados de três extrações independentes.

<sup>b</sup> A análise da eletroforese em gel de agarose do DNA extraído usando diferentes métodos foi mostrada entre colchetes. [-]: ausência de bandas; [+]: bandas fracas; [+ +]: bandas fortes.

<sup>c</sup> Na sexta coluna foi mostrado o número de resultados positivos da PCR com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER para o total de reações realizadas.

<sup>d</sup> Nd: não foi possível determinar a razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> devido à baixa concentração de DNA nas amostras.

<sup>e</sup> CTAB: cetil trimetil amônio.

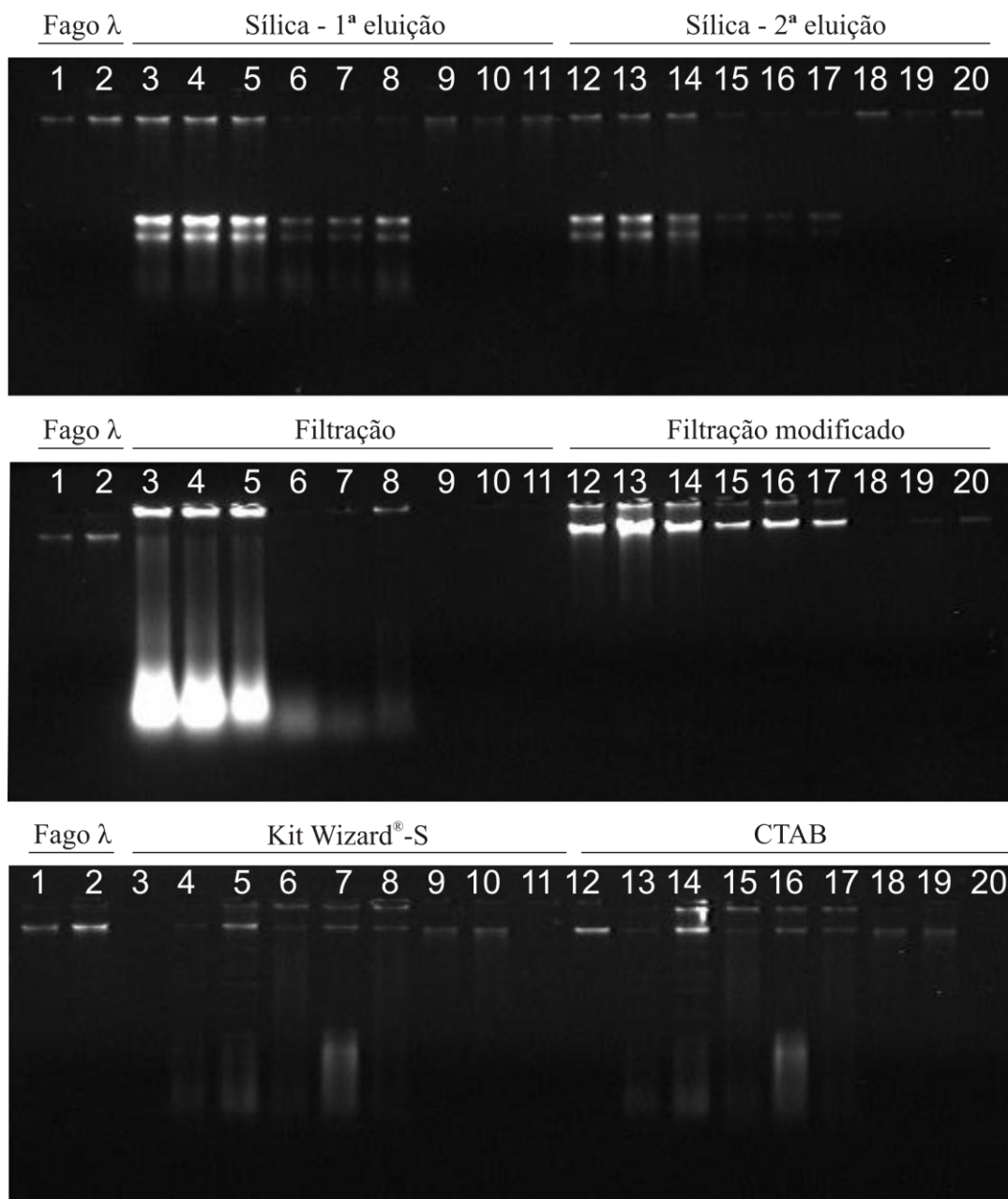


Figura 1 – Avaliação da concentração e da qualidade do DNA total por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. As preparações de DNA total foram obtidas a partir de amostras de leite inoculado com *E. coli* (números 3 a 5 e 12 a 14), com *P. fluorescens* (números 6 a 8 e 15 a 17) e de leite cru (números 9 a 11 e 18 a 20). O DNA do fago  $\lambda$  foi utilizado como padrão de concentração: 25 ng (número 1) e 50 ng (número 2).

As concentrações de DNA total obtido a partir de amostras de leite, inoculadas ou não, variaram de 5,7 a 3460 ng/μl (Tabela 3). Maiores concentrações foram obtidas quando se utilizou a técnica de enriquecimento a partir do inóculo de 0,1 ml de leite em 100 ml de caldo LB, com incubação por 6 h. Além de aumentar a população microbiana, esta etapa de enriquecimento dilui possíveis interferentes presentes nas amostras de leite.

Alguns métodos de extração não foram eficientes em remover o RNA total, portanto em análise por espectrofotometria, houve superestimação dos resultados, o que pode ser confirmado pelos resultados contrastantes entre a razão  $A_{260}/A_{280}$  e o gel de agarose. Além disso, as duas bandas que migraram para a parte inferior do gel de agarose 0,8 % (Figura 1) evidentes nas canaletas 3 a 8 e 12 a 17 referentes à extração de DNA total pelo método que utiliza sílica confirmam a presença de RNA. Uma possível explicação é o uso de tampão de lise contendo altas concentrações de tiocianato de guanidina, substância desnaturante, que garante o rompimento celular eficiente, a solubilização dos seus componentes e a desnaturação de RNases endógenas o que torna possível a extração de RNA (Sambrook e Russel, 2001). Uma vez solubilizados, os ácidos nucleicos se ligam às partículas de sílica e são purificados por sucessivas etapas de lavagem. A presença de RNA nas amostras interfere na quantificação de DNA por espectrofotometria uma vez que os ácidos nucleicos de fita simples também absorvem luz a 260 nm.

Os resultados da extração utilizando o protocolo kit Wizard<sup>®</sup>-S mostraram rendimentos menores de DNA total quando comparado aos resultados dos outros métodos citados anteriormente (Tabela 3).

O método que utiliza CTAB demonstrou ser menos adequado para extração de DNA total de leite cru baseado no número de reações de PCR consideradas positivas quando comparado ao método de filtração modificado. No entanto, Pirondini et al. (2010) constataram que esse método foi mais eficiente para extração de DNA total de amostras de produtos lácteos que não passaram por processos de esterilização quando comparado com kits comerciais e métodos que utilizam dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tween<sup>®</sup>.

A pureza das amostras de DNA obtidos a partir de amostras de leite, inoculadas ou não, variou entre 1,4 e 2,0. A pureza de uma preparação de DNA pode ser facilmente avaliada por espectrofotometria na região do ultravioleta. Essa

avaliação é feita pela determinação da razão  $A_{260}/A_{280}$ . A razão ótima para amostras de DNA está entre 1,8 e 1,9 e a presença de proteínas tende a reduzir esse valor (Azevedo et al., 2003). A análise por eletroforese em gel de agarose mostrou que o DNA extraído pelos métodos de filtração, filtração modificado, kit Wizard®-S e CTAB ficou retido na canaleta o que sugere a contaminação das amostras por polissacarídeos e proteínas. Além desses interferentes, o leite contém altas concentrações de  $Ca^{+2}$ , proteases, nucleases, ácidos graxos que são inibidores da PCR. Os inibidores podem ser substâncias quelantes de cátions ou substâncias que se ligam ou degradam a polimerase e o molde de DNA que devem ser eliminados ou diluídos para garantir a sensibilidade da técnica de PCR (Sambrook e Russel, 2001). Neste sentido, a técnica de PCR foi utilizada com o objetivo de obter informações adicionais sobre a qualidade das preparações de DNA e avaliar a eficiência do método utilizado. Não foi possível detectar a presença do fragmento amplificado quando foram analisadas as amostras de leite esterilizado contaminado com até  $2,0 \times 10^9$  UFC/ml de *E. coli* visto que o par de oligonucleotídeos utilizados para análise por PCR era específico para rDNA 16S de *P. fluorescens*.

Embora a técnica de PCR seja sensível, o produto da amplificação do rDNA 16S de *P. fluorescens* não foi observado nas amostras de DNA obtido a partir de amostras de leite contaminado com, aproximadamente,  $10^8$  UFC/ml de *P. fluorescens* e de leite cru com  $10^6$  UFC/ml de psicrotóxicos pelo método que utiliza sílica e pelo método de filtração. A presença de inibidores da PCR pode tornar difícil a detecção de células bacterianas, pois na presença de alguns contaminantes a DNA polimerase não é capaz de sintetizar DNA suficiente para que o produto da reação seja detectado e a reação considerada positiva. A preparação adequada das amostras de DNA garante a diluição ou a eliminação dos interferentes e o sucesso da técnica de PCR (Maurer, 2006). As análises por espectrofotometria (Tabela 3) e por eletroforese gel de agarose (Figura 1) demonstraram que estas amostras de DNA obtidas pelo método que utiliza sílica e pelo método de filtração estavam contaminadas com proteínas, polissacarídeos, RNA e DNA parcialmente degradado. Esses interferentes podem ter inibido a DNA polimerase o que justifica os resultados falso negativos obtidos quando as amostras de leite contaminadas com, aproximadamente,  $10^8$  UFC/ml de *P. fluorescens* foram avaliadas. O método que utiliza sílica e o método de filtração não foram utilizados nas próximas etapas assim como o método que utiliza CTAB que

forneceu 33,3 % e 66,6 % de resultados positivos com as amostras de leite cru e leite contaminado com *P. fluorescens*, respectivamente, quando analisadas pela técnica de PCR.

A extração de DNA total pelo kit Wizard<sup>®</sup>-S e o método de filtração modificado foram selecionados para a continuação do trabalho. A utilização desses métodos de extração de DNA permitiu a detecção do produto de amplificação correspondente ao gene rDNA 16S com todas as preparações de DNA extraído a partir das amostras de leite contaminadas com, aproximadamente, 10<sup>8</sup> UFC/ml de *P. fluorescens*. Além disso, o kit Wizard<sup>®</sup>-S e o método de filtração modificado forneceram, respectivamente, 100 % e 66,6 % de resultados positivos na análise das amostras de leite cru com contagem de 2,0 x 10<sup>6</sup> UFC/ml de psicotróficos, indicando a presença de *P. fluorescens* como contaminante. Apesar da etapa de enriquecimento realizada no método de filtração modificado, o inóculo de 100 µl de leite cru em 100 ml de caldo LB não garantiu a totalidade de resultados positivos quando as preparações de DNA foram analisadas por PCR.

Na tentativa de se obter maior eficiência da extração de DNA total a partir de leite cru pelo método de filtração modificado, modificações no volume de leite inoculado em 100 ml de caldo LB foram avaliadas (Figura 2).

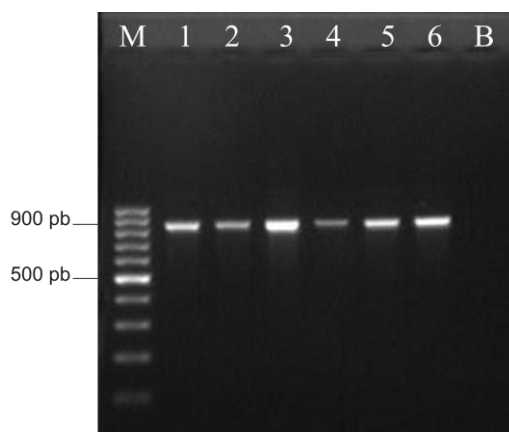


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR para detecção de *P. fluorescens*. A reação foi realizada com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER a partir de amostras de DNA total extraídas pelo método de filtração modificado com cada um dos inóculos testados. Os números correspondem ao DNA total de *P. fluorescens* ATCC 13525 (1); inóculo de 100 µl (2) e 1 ml (3); inóculo de células coletadas em 100 µl (4), 1 ml (5) e 10 ml (6) de leite cru; M corresponde ao marcador GeneRuler<sup>™</sup> DNA Ladder 100 pb (Fermentas, EUA) e B ao controle negativo.

O inóculo de 1 ml de leite com posterior incubação por 6 h não requer a etapa de centrifugação e aumentou o rendimento da reação de PCR mas não aumentou a concentração de interferentes da reação, o que poderia prejudicar a ação da DNA polimerase. Logo, esta modificação foi adotada nas etapas seguintes. O meio de enriquecimento quando inoculado com 10 ml de leite cru não pode ser filtrado em membrana com poro de 0,22 µm.

#### **4.2. Limite de detecção de *P. fluorescens* em leite por PCR**

A extração de DNA total das amostras de leite inoculado com *P. fluorescens* pelo kit Wizard<sup>®</sup>-S possibilitou a detecção do produto da reação utilizando o par de oligonucleotídeos FP aprI/RP aprII que amplifica um fragmento de 194 pb do gene *aprX* quando o leite estava contaminado com  $2,4 \times 10^9$  UFC/ml de *P. fluorescens* (Figura 3). Embora o limite de detecção tenha diminuído quando o método de filtração seguido de purificação foi utilizado, a presença do amplificado foi detectada quando a população de *P. fluorescens* variou entre  $3,2 \times 10^7$  e  $2,4 \times 10^9$  UFC/ml.

Martins et al. (2005) utilizaram esses oligonucleotídeos para detecção de *P. fluorescens* em amostras de leite desnatado reconstituído e detectaram o produto de amplificação do gene quando a população de *P. fluorescens* estava acima de  $2,4 \times 10^5$  UFC/ml. Essa variação pode estar relacionada às características bioquímicas do leite cru que são diferentes daquelas do leite disponível no mercado ou do leite desnatado reconstituído (Ercolini et al., 2004). A variação da sensibilidade da técnica demonstra a importância das etapas de enriquecimento, filtração e purificação que minimizam a contaminação das preparações de DNA com interferentes da PCR.

Quando oligonucleotídeos SM2F/SM3R, que amplificam um fragmento de 900 pb do gene *aprX*, foram utilizados, a sensibilidade do método aumentou e o produto da reação foi detectado nas amostras DNA total extraído pelo kit Wizard<sup>®</sup>-S obtidos a partir de leite inoculado com *P. fluorescens* com população acima de  $3,5 \times 10^4$  UFC/ml (Figura 3). (Marchand et al., 2009b) também verificaram maior sensibilidade na detecção de *P. fluorescens* inoculada em leite com os oligonucleotídeos SM2F/SM3R que detectaram  $2,1 \times 10^3$  UFC/mL quando comparado aos oligonucleotídeos FP aprI/RP aprII. A sensibilidade foi aumentada e o limite de detecção foi de  $6,7 \times 10^2$  UFC/ml quando foi utilizado o método de

filtração modificado. O método de filtração modificado apresenta potencial para análise de amostras pouco contaminadas porque há uma etapa de enriquecimento que permite o aumento do número de células contaminantes. Já o método que utiliza o kit Wizard<sup>®</sup>-S é menos sensível e mais adequado para análise de amostras muito contaminadas. Entretanto, o tempo necessário para a preparação do DNA com o kit Wizard<sup>®</sup>-S é menor.

A utilização do par de oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER resultou no aumento da sensibilidade do método e o produto da reação foi detectado quando a população de *P. fluorescens* estava acima de  $3,8 \times 10^3$  UFC/ml com o protocolo de extração de DNA do kit Wizard<sup>®</sup>-S.

Os fragmentos amplificados utilizando os oligonucleotídeos SM2F/SM3R e 16SPSEfluF/16SPSER tem, aproximadamente, o mesmo tamanho, 900 e 850 pb, respectivamente. No entanto, o limite de detecção utilizando 16SPSEfluF/16SPSER foi menor, o que pode ser explicado pela eficiência específica de anelamento dos oligonucleotídeos, pelas condições de amplificação e, principalmente, pelo número de cópias do gene alvo no genoma (Ercolini et al., 2004; Farrelly et al., 1995). O maior número de cópias do gene rRNA 16S pode justificar a maior sensibilidade do método ao utilizar esse gene alvo. Os genes que codificam rRNAs 5S, 16S e 23 S são organizados no operon *rrn* nos membros do domínio *Bacteria* (Klappenbach et al., 2000) sendo que o número de cópias pode variar entre 1 e 15 por genoma bacteriano (Rainey et al., 1996). *P. aeruginosa* apresenta quatro cópias do operon *rrn* por genoma enquanto *E. coli* possui sete cópias (Farrelly et al., 1995).

Como os oligonucleotídeos SM2F/SM3R e 16SPSEfluF/16SPSER apresentaram maior sensibilidade, eles foram selecionados para as etapas posteriores de avaliação do método.

#### **4.3. Avaliação do método de detecção de *P. fluorescens* por PCR para análise de leite cru**

A população de psicrotóxicos inicial nas amostras de leite cru variou de  $3,2 \times 10^3$  a  $2,7 \times 10^4$  UFC/ml e alcançou a fase estacionária de crescimento entre o quarto e o quinto dia de incubação a 7 °C com números próximos a  $10^9$  UFC/ml (Figura 4).

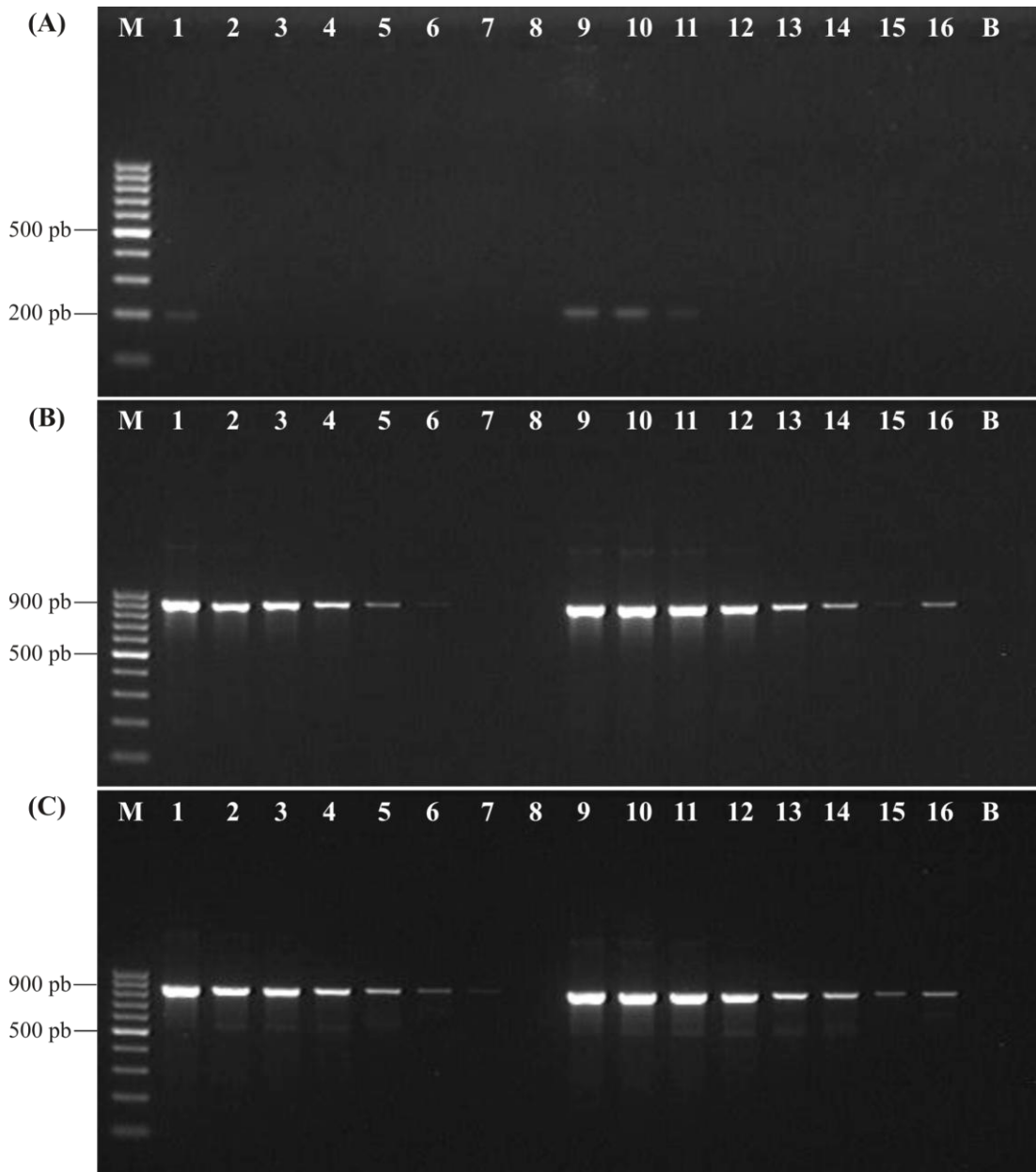


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % para avaliação do limite de detecção de *P. fluorescens* por PCR em leite esterilizado e inoculado com essa espécie. Os fragmentos de DNA foram amplificados com os oligonucleotídeos FP aprI/RP aprII (A), SM2F/SM3R (B) e 16SPSEfluF/16SPSER (C). O DNA total foi extraído pelo kit Wizard<sup>®</sup>-S (números de 1 a 8) e pelo método de filtração modificado (números de 9 a 16). Os números 1 e 9 correspondem a  $2,4 \times 10^9$  UFC/ml; 2 e 10 a  $3,4 \times 10^8$  UFC/ml; 3 e 11 a  $3,2 \times 10^7$  UFC/ml; 4 e 12 a  $3,2 \times 10^6$  UFC/ml; 5 e 13 a  $3,5 \times 10^5$  UFC/ml; 6 e 14 a  $3,5 \times 10^4$  UFC/ml; 7 e 15 a  $3,8 \times 10^3$  UFC/ml; 8 e 16 a  $6,7 \times 10^2$  UFC/ml; M corresponde ao marcador GeneRuler<sup>™</sup> DNA Ladder 100 pb (Fermentas, EUA) e B ao controle negativo.

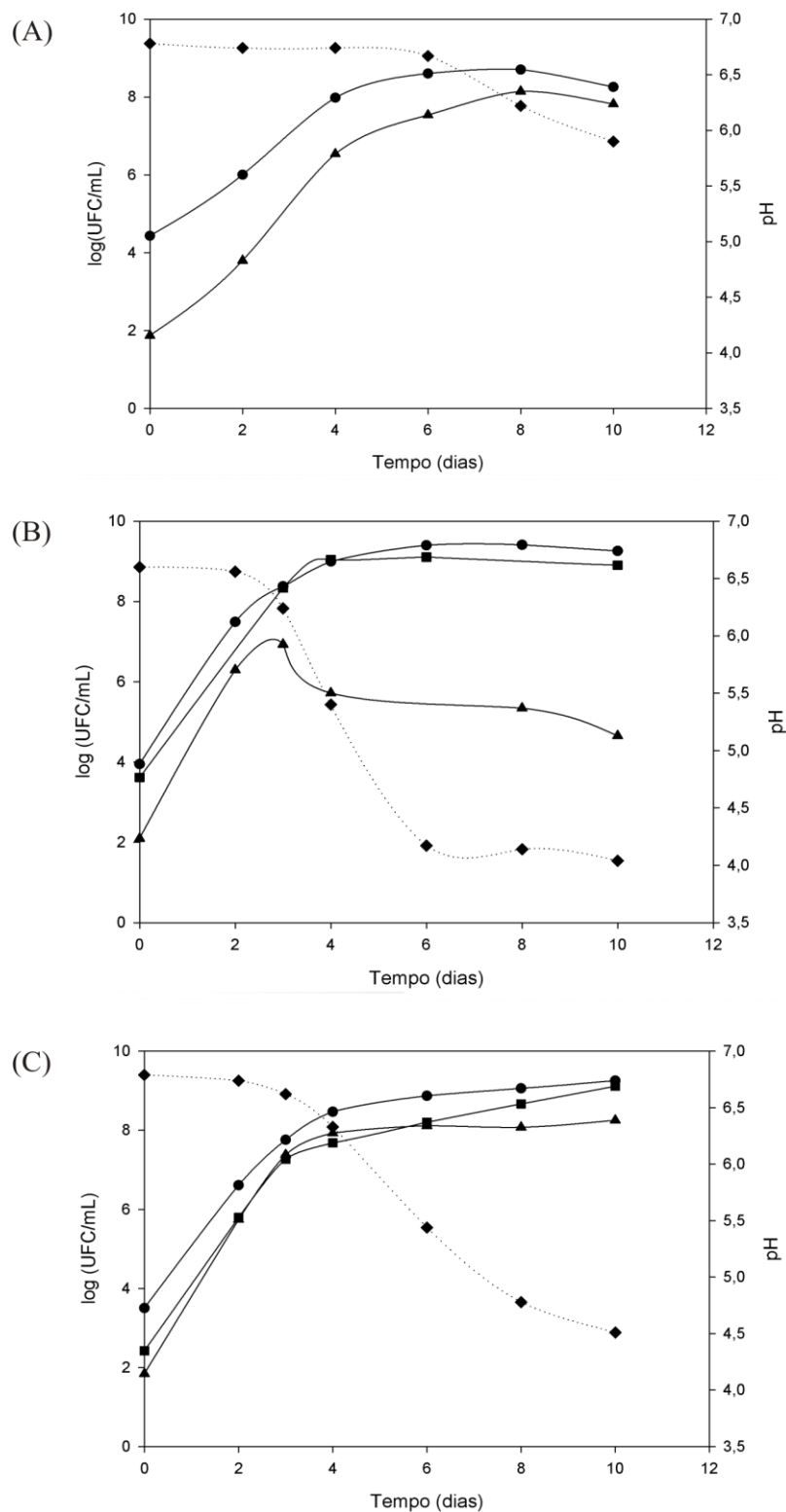


Figura 4 – População de bactérias psicrotróficas (—●—), psicrotróficas proteolíticas (—■—) e *Pseudomonas* (—▲—) e evolução do pH (··◆··) em leite cru incubado a 7 °C ao longo de 10 dias das repetições I (A), II (B) e III (C).

Os psicrotróficos proteolíticos, analisados nas repetições II e III, apresentaram comportamento semelhante ao dos psicrotróficos ao longo de 10 dias de incubação (Figura 4). A população inicial foi de  $4,1 \times 10^3$  UFC/ml na repetição II e  $2,6 \times 10^2$  UFC/ml na repetição III. As amostras analisadas neste trabalho têm uma contaminação baixa porque foram coletadas imediatamente após ordenha em estabelecimento que atende aos parâmetros de sanidade do rebanho e de higiene na produção estabelecidos pela Instrução Normativa n° 51 para produção de leite Tipo B (Brasil, 2002).

Embora a contagem de *Pseudomonas* em ágar CFC tenha revelado contaminação inicial entre  $7,0 \times 10^1$  e  $7,5 \times 10^2$  UFC/ml, o número final, após 10 dias de incubação a 7 °C, alcançou  $10^8$  UFC/ml, como observado nas repetições I e III. Resultados semelhantes foram apresentados por De Jonghe et al. (2011) que simularam as condições de armazenamento e transporte de amostras de leite cru refrigerado e demonstraram que a população inicial de  $10^2$  UFC/ml de *Pseudomonas* alcançou  $10^8$  UFC/ml após 5 dias de incubação a 6 °C.

O mesmo comportamento da população de *Pseudomonas* não foi constatado na repetição II, onde o número máximo de células foi de  $8,6 \times 10^6$  UFC/ml. A inibição da população de *Pseudomonas* pode estar relacionada à contaminação do leite por bactérias produtoras de ácido que reduziram o pH de 6,6 para 4,0 (Figura 4). A contagem de bactérias lácticas feita especificamente nesta repetição pode esclarecer a razão da queda do pH, uma vez que foi detectada uma população de  $1,6 \times 10^9$  UFC/ml de bactérias produtoras de ácido e catalase negativas após oito dias de incubação a 7 °C. Matamoros et al. (2009) demonstraram que alguns isolados psicrotróficos de bactérias lácticas podem inibir a população de *Pseudomonas* spp. por acidificação do meio ou por competição nutricional.

As amostras de leite cru refrigerado foram analisadas por PCR periodicamente. Fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos SM2F/SM3R e 16SPSEfluF/16SPSER não foram detectados, nas repetições II e III, quando o DNA total foi extraído pelo kit Wizard<sup>®</sup>-S (Figuras 5 e 6).

A ausência do produto de amplificação nas amostras de DNA extraídas com o kit Wizard<sup>®</sup>-S pode ser justificada pelo baixo rendimento DNA extraído por esse método, como apresentado na Tabela 2 ou pela presença de interferentes que inibem a DNA polimerase.

Quando o DNA foi extraído pelo método de filtração modificado, o fragmento amplificado com os oligonucleotídeos SM2F/SM3R foi observado no segundo e/ou terceiro dia de incubação nas repetições II e III (Figura 5). O produto da reação foi detectado quando a população de *Pseudomonas* era da ordem de  $10^6$  e  $10^7$  UFC/ml nas repetições II e III, respectivamente. Neste mesmo período de incubação, a população de psicotróficos estava entre  $4,1 \times 10^6$  UFC/ml e  $3,1 \times 10^7$  UFC/ml, na repetição II, e  $2,4 \times 10^7$  UFC/ml e  $5,8 \times 10^7$  UFC/ml, na repetição III. Na repetição I o fragmento amplificado foi observado após 10 dias de incubação a  $7^\circ\text{C}$  quando a população de psicotróficos atingiu  $1,8 \times 10^8$  UFC/ml (Figura 5).

O perfil de amplificação do DNA foi diferente quando as amostras foram analisadas com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER (Figura 6). Nas repetições II e III, o amplificado foi observado quando a contagem de *Pseudomonas* era da ordem de  $10^6$  UFC/ml e a população de psicotróficos, na fase estacionária de crescimento, estava entre  $3,0 \times 10^7$  UFC/ml e  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml. Na repetição I, foi possível detectar o amplificado após 2 dias de incubação da amostra de leite cru sob refrigeração. Nesse período de incubação, tempo máximo permitido pela Instrução Normativa nº 51, a população de *Pseudomonas* atingiu  $6,3 \times 10^3$  UFC/ml e de psicotróficos,  $1,0 \times 10^6$  UFC/ml.

Embora a legislação brasileira não estabeleça um limite para contagem de psicotróficos em leite cru, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA fornece a indicação de que a população de psicotróficos não deve exceder 10 % da população de mesófilos (Brasil, 1980).

Como a Instrução Normativa nº 51 estabelece que a contagem de mesófilos em leite cru refrigerado de tanque coletivo não deve exceder  $3,0 \times 10^5$  UFC/ml a partir de 01 de julho de 2012 (Brasil, 2002), a população de psicotróficos deveria ser menor que  $3,0 \times 10^4$  UFC/ml.

O fragmento amplificado com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/ 16SPSER não foi observado, nas repetições II e III, após oito e dez dias de incubação do leite cru a  $7^\circ\text{C}$ , respectivamente (Figura 6). Como estes oligonucleotídeos são específicos para *P. fluorescens*, é provável que outras espécies tenham dominado a microbiota do leite após período prolongado de incubação a  $7^\circ\text{C}$ .

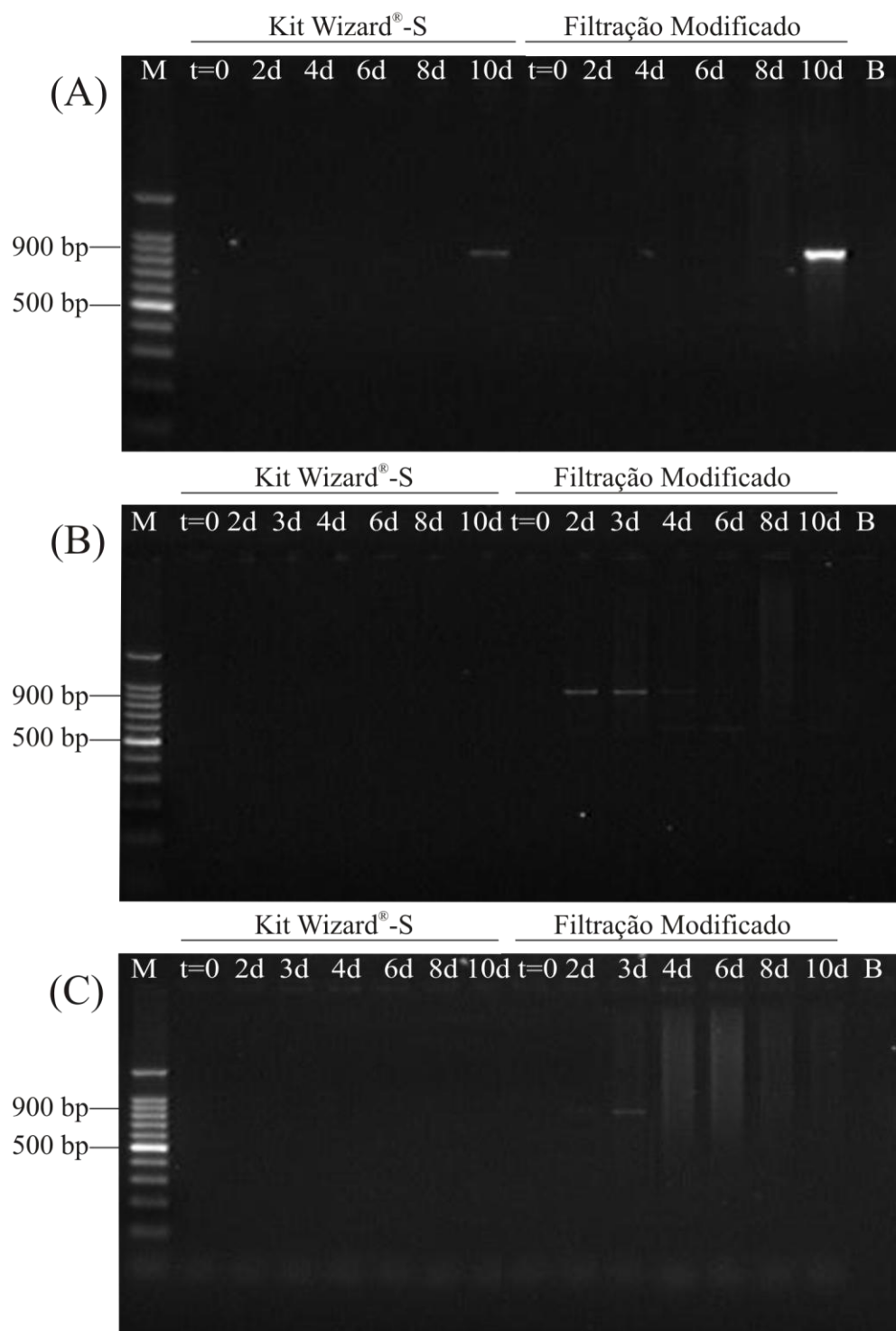


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % para avaliação do limite de detecção por PCR de *P. fluorescens* em leite cru incubado a 7 °C por 10 dias. Os fragmentos de DNA foram amplificados com os oligonucleóides SM2F/SM3R. As legendas correspondem a 0 - leite recém-ordenhado, 2d, 3d, 4d, 6d, 8d e 10d – leite após dois, três, quatro, seis, oito e dez dias de incubação, respectivamente; (A) - Repetição I; (B) - Repetição II e (C) - Repetição III. M corresponde ao marcador DNA Ladder 100 pb (Promega, EUA) e B ao controle negativo.

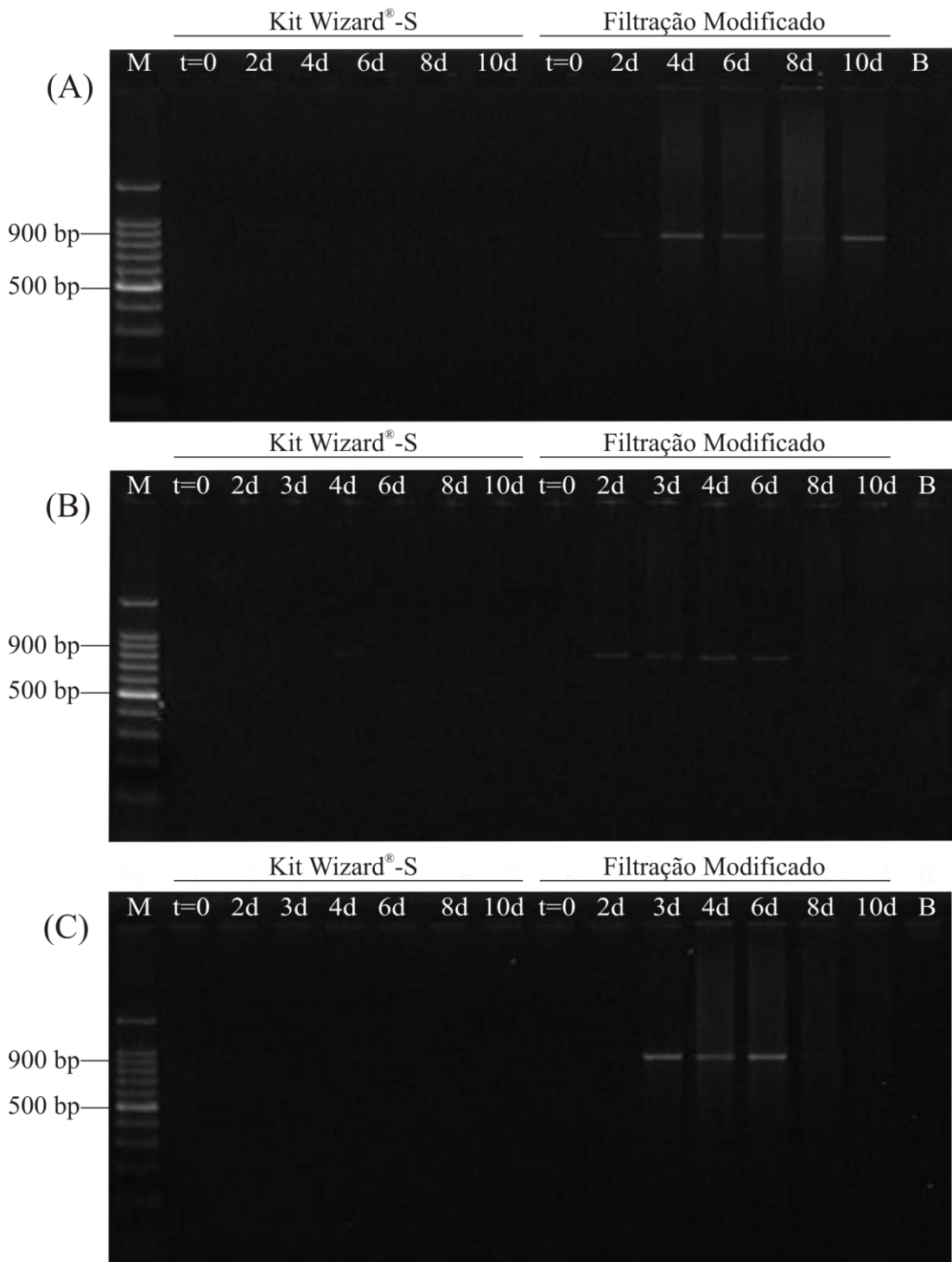


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % para avaliação do limite de detecção por PCR de *P. fluorescens* em leite cru incubado a 7 °C por 10 dias. Os fragmentos de DNA foram amplificados com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER. As legendas correspondem a 0 - leite recém-ordenhado, 2d, 3d, 4d, 6d, 8d e 10d – leite após dois, três, quatro, seis, oito e dez dias de incubação, respectivamente; (A) - Repetição I; (B) - Repetição II e (C) - Repetição III. M corresponde ao marcador DNA Ladder 100 pb (Promega, EUA) e B ao controle negativo.

A colônia típica predominante nas placas de CFC para contagem de *Pseudomonas* isolada na repetição II não foi identificada pelo kit RapID™ NF Plus que é específico para gram-negativos oxidase positivos. Na repetição III, a colônia predominante no ágar CFC foi identificada como *Acinetobacter* sp. com 65 % de confiança. Segundo Rasolofu et al. (2010), bactérias do gênero *Acinetobacter* fazem parte da microbiota dominante presente em leite cru refrigerado. Além disso, outras bactérias do gênero *Pseudomonas* podem dominar a microbiota como demonstrado por Marchand et al. (2009a) que identificaram *P. lundensis* e *P. fragi* como produtores de proteases termorresistentes predominantes em leite cru refrigerado. Na repetição I, na qual o fragmento amplificado com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER, específicos para *P. fluorescens*, foi observado do quarto ao décimo dia de incubação. A colônia predominante nas placas de ágar CFC foi identificada com o kit RapID™ NF Plus como *P. fluorescens/P. putida* com 98 % de confiança.

Nas três repetições, o fragmento amplificado com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER foi observado quando as amostras, cujo DNA total foi extraído pelo método de filtração modificado, apresentavam população de psicrotóxicos na fase estacionária de crescimento (Figura 6). A presença do amplificado apenas quando a população estava acima de  $10^6$  UFC/ml pode representar o comprometimento da qualidade do leite cru refrigerado pela atividade de proteases. A produção dessas enzimas por micro-organismos psicrotóxicos acontece no final da fase logarítmica e durante a fase estacionária de crescimento (Chen et al., 2003; Pinto, 2005; Sørhaug e Stepaniak, 1997). Pinto (2005) avaliou a correlação entre a população de um isolado de *P. fluorescens* e a atividade proteolítica em leite desnatado reconstituído 12 % e observou a detecção de proteases em população maior que  $10^8$  UFC/ml. No entanto, Kumaresan et al. (2007) observaram a deterioração do leite cru, devido à atividade proteolítica, quando a população de psicrotóxicos estava acima de  $10^6$  UFC/ml.

### **3.5. Avaliação da proteólise da caseína das amostras de leite cru**

O efeito da atividade de micro-organismos psicrotóxicos proteolíticos nas proteínas do leite foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 7). Nenhuma alteração nas frações de caseína foi observada nas repetições I e II,

mesmo com a população de psicrotróficos alcançando, respectivamente,  $1,8 \times 10^8$  e  $1,8 \times 10^9$  UFC/ml após 10 dias de incubação.

No entanto, a banda de para- $\kappa$ -caseína, produto da hidrólise da  $\kappa$ -caseína, pode ser observada na repetição III a partir do quarto dia de incubação do leite cru a  $7^\circ\text{C}$  quando a população de psicrotróficos e de *Pseudomonas* atingiram a fase estacionária com contagem de  $3,0 \times 10^8$  e  $8,5 \times 10^7$  UFC/ml, respectivamente (Figura 7). Pinto (2004) também observou que a inoculação de  $10^6$  UFC/ml de um isolado de leite cru refrigerado de *P. fluorescens* levou à hidrólise das frações de caseína quando leite foi incubado sob refrigeração.

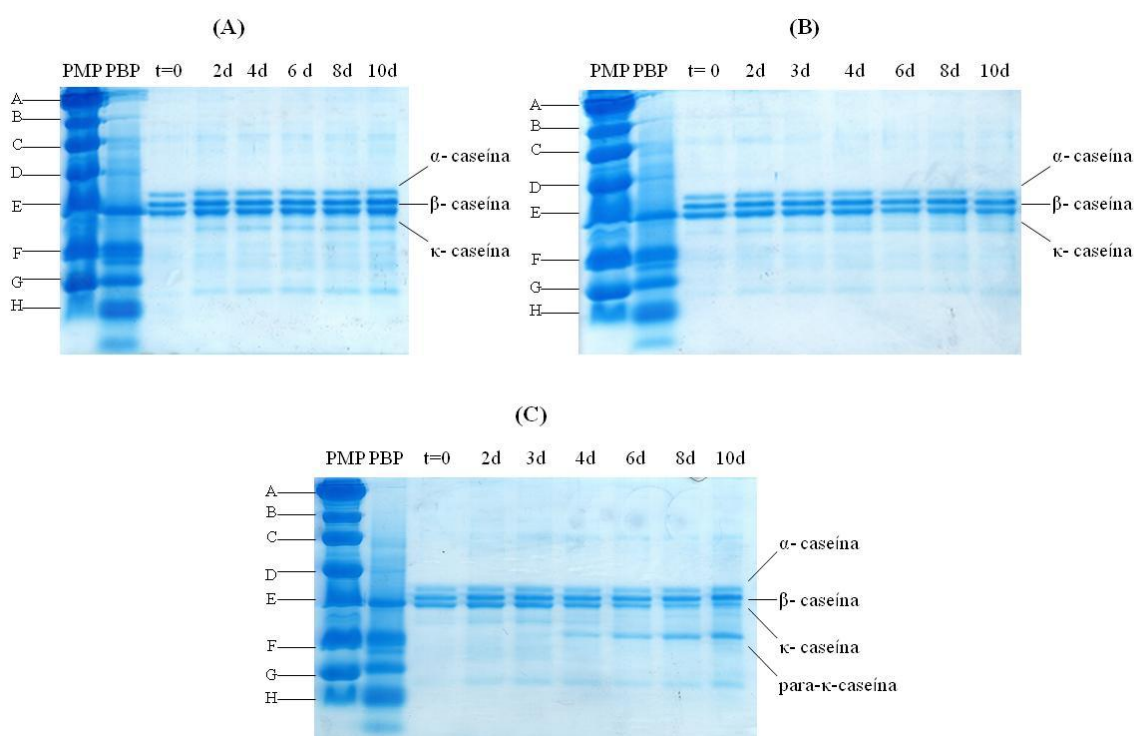


Figura 7 – Avaliação da degradação da caseína de leite cru incubado a  $7^\circ\text{C}$  ao longo de 10 dias por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % revelado com azul de Coomassie. As legendas correspondem a 0 - leite recém-ordenhado, 2 d, 3 d, 4 d, 6 d, 8 d e 10 d - leite após dois, três, quatro, seis, oito e dez dias de incubação, respectivamente. PMP corresponde ao padrão de peso molecular de ampla faixa (Bio-Rad, EUA) e PMB ao padrão de baixo peso molecular (Promega, Madison, EUA). O padrão PMP contém: (A)  $\beta$ -galactosidase (116,25 kDa), (B) Fosforilase B (97,4 kDa), (C) Albumina de soro (66,2 kDa), (D) Ovoalbumina (45,0 kDa), (E) Anidrase carbônica (31,0 kDa), (F) Inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), (G) Lisozima (14,4 kDa) e (H) Aprotinina (6,5 kDa). (A) - repetição I, (B) - repetição II e (C) - repetição III.

Embora a população de psicrotróficos tenha atingido a fase estacionária em leite cru após quatro dias de incubação nas três repetições, foi constatado que o padrão de proteólise diferiu entre as repetições. Esta variação pode estar relacionada ao tipo de microbiota contaminante em cada uma das repetições. Na repetição II, foi constatada a predominância de bactérias produtoras de ácido o que pode justificar a ausência das bandas de para- $\kappa$ -caseína no leite cru refrigerado por 10 dias analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Além disso, as proteases produzidas por *Pseudomonas* apresentam uma atividade residual em temperaturas de refrigeração, mas têm atividade ótima em temperatura entre 30 e 45 °C o que pode explicar a ausência de proteólise detectável pela metodologia utilizada (Dufour et al., 2008; Martins, 2007; Sørhaug e Stepaniak, 1997).

A variabilidade entre os isolados psicrotróficos proteolíticos também pode justificar a variação da proteólise do leite entre as repetições. Martins et al. (2006) e Dogan e Boor (2004) demonstraram a diversidade genética de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado. Quando foram analisadas 10 estirpes de *P. fluorescens*, sendo três delas isoladas de ambiente industrial, Dufour et al. (2008) demonstraram a variação na atividade caseinolítica dos isolados.

Outro fator que pode afetar a proteólise do leite é a presença de proteases nativas termoestáveis, conhecidas como plasmina (Nielsen, 2002). Pode-se concluir que a informação sobre o número de psicrotróficos proteolíticos ou de bactérias do gênero *Pseudomonas* não é suficiente para determinar o grau de proteólise do leite. Informações sobre o tipo de microbiota contaminante também são importantes para análise da qualidade do leite.

Apesar da variação observada quando a proteólise do leite foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida, nas três repetições foi possível observar o produto da reação de PCR com os oligonucleotídeos 16SPSEfluF/16SPSER mesmo que a proteólise não tenha sido observada.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método de filtração modificado para extração de DNA total de amostras de leite cru permitiu o aumento do limite de detecção da técnica de PCR para  $10^2$  UFC/ml de *P. fluorescens*. Este resultado é promissor para monitoramento da qualidade de leite cru quando o rDNA 16S de *P. fluorescens* é amplificado.

A seleção e adaptação de diferentes protocolos permitiram o estabelecimento de uma condição apropriada e mais sensível para detecção de *P. fluorescens* em leite cru por PCR.

A avaliação da proteólise das amostras de leite cru refrigerado demonstrou que o tipo de microbiota contaminante entre outros fatores pode afetar a qualidade do produto. Logo, o desenvolvimento da técnica de PCR multiplex para detecção dos principais psicrotóxicos proteolíticos além de *P. fluorescens* é importante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arcuri, E.F., Silva, P.D.L., Brito, M.A.V.P., Brito, J.R.F., Lange, C.C., Magalhães, M.M.A., 2008. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotólicas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural* 38, 2250-2255.

Azevedo, M.O., Felipe, M.S.S., Brígido, M.M., Maranhão, A.Q., De Souza, M.T., 2003. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular* Editora Universidade de Brasília, Brasília.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Brasília: 1980. 116 p.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de Leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, p.8-13, 2002.

Cardoso, R.R., 2006. Influência da microbiota psicrotófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Celestino, E.L., Iyer, M., Roginski, H., 1997. Reconstituted UHT-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. *International Dairy Journal* 7, 129-140.

Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T., 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* 13, 255-275.

Cooper, T.G., 1977. *The Tools of Biochemistry*. 1 ed. John Wiley and Sons, New York.

Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., 2006. Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *Journal of Dairy Science* 89, 163-169.

De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Landshoot, A., De Vos, P., Heyndrickx, M., 2011. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environment Microbiology* 77, 460-470.

Dogan, B., Boor, K.J., 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environment Microbiology* 69, 130-138.

Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., Gaillard, J.-L., Dary, A., 2008. 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* 125, 188-196.

Dupont, D., Lugand, D., Rolet-Repecaud, O., Degelaen, J., 2007. ELISA to detect proteolysis of ultrahigh-temperature milk upon storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6857-6862.

Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V., Coppola, S., 2004. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1090-1096.

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F., 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26, 228-231.

Farrelly, V., Rainey, F.A., Stackebrandt, E., 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environment Microbiology* 61, 2798-2801.

Hantis-Zacharov, E., Halpern, M., 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environment Microbiology* 73, 7162-7168.

IDF. Standard n° 101A. Enumeration of psychrotrophic microorganisms - Colony count at 6.5°C. Bruxelles, 1991a.

IDF. Standard n° 132A. Enumeration of psychrotrophic microorganisms - Colony count at 21°C. Bruxelles, 1991b.

Jay, J.M., 2005. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Artmed Editora S.A., Porto Alegre.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1328-1333.

Kumaresan, G., Annalvilli, R., Sivakumar, K., 2007. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Sciences Research* 3, 1383-1387.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lantz, P.-G., Abu Al-Soud, W., Knutsson, R., Hahn-Hägerdal, B., Rådström, P., 2000. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples, *Biotechnology Annual Review*, vol. 5. Elsevier. 87-130.

Machado, A.D.S., 2006. Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Marchand, S., Coudijzer, K., Heyndrickx, M., Dewettinck, K., De Block, J., 2008. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. *International Dairy Journal* 18, 514-519.

Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J., Heyndrickx, M., 2009a. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environmental Microbiology* 11, 467-482.

Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., De Vos, P., Devreese, B., Heyndrickx, M., De Block, J., 2009b. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology* 133, 68-77.

Martins, M.L., 2007. Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e *quorum sensing* em bactérias psicrotróficas isoladas de leite, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Martins, M.L., de Araújo, E.F., Mantovani, H.C., Moraes, C.A., Vanetti, M.C.D., 2005. Detection of the *apr* gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 102, 203-211.

Martins, M.L., Pinto, C.L.O., Rocha, R.B., de Araújo, E.F., Vanetti, M.C.D., 2006. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 111, 144-148.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H., Leroi, F., 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26, 638-644.

Matta, H., Punj, V., Kanwar, S.S., 1997. An immuno-dot blot assay for detection of thermostable protease from *Pseudomonas* sp. AFT-36 of dairy origin. Letters in Applied Microbiology 25, 300-302.

Maurer, J., 2006. PCR Methods in Foods. 1 ed. Springer, New York.

Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T., 2006. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. Microbiological Research 161, 334-346.

Nicodème, M., Grill, J.-P., Humbert, G., Gaillard, J.-L., 2005. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. Journal of Applied Microbiology 99, 641-648.

Nielsen, S.S., 2002. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 6628-6624.

Pinto, C.L.O., 2004. Bactérias psicotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Pinto, U.M., 2005. *Quorum sensing* em bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Pirondini, A., Bonas, U., Maestri, E., Visioli, G., Marmiroli, M., Marmiroli, N., 2010. Yield and amplificability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain. Food Control 21, 663-668.

Raats, D., Offek, M., Minz, D., Halpern, M., 2011. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. Food Microbiology 28, 465-471.

Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Janssen, P.H., Hippe, H., Stackebrandt, E., 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 730aT contains multiple 16s rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. Microbiology 142, 2087-2095.

Rasolofo, E.A., St-Gelais, D., LaPointe, G., Roy, D., 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. International Journal of Food Microbiology 138, 108-118.

Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Scarpellini, M., Franzetti, L., Galli, A., 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. FEMS Microbiology Letters 236, 257-260.

Sørhaug, T., Stepaniak, L., 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. Trends in Food Science & Technology 8, 35-41.

Stulova, I., Adamberg, S., Krisciunaite, T., Kämpura, M., Blank, L., Laht, T.-M., 2010. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. *Letters in Applied Microbiology* 51, 683-690.

Swanson, K.M.J., Petran, R.L., Hanlin, J.H., 2001. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. In: DOWNES, F.P., ITO, K., (Eds.), *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*, 4 ed. American Public Health Association, Washington. 57-58.

Vanetti, M.C.D., 2009. Spoilage Detection. In: Nollet, L.M.L., Toldrá, F., (Eds.), *Handbook of Dairy Foods Analysis*. CRC Press, Boca Raton. 665-676.

Wu, S.-J., Kado, C.I., 2004. Preparation of milk samples for PCR analysis using a rapid filtration technique. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1342-1346.