

MAURILIO LOPES MARTINS

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS PROTEOLÍTICAS DE LEITE  
E PRESENÇA DO GENE QUE CODIFICA METALOPROTEASE ALCALINA

Tese 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  
2003

MAURILIO LOPES MARTINS

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS PROTEOLÍTICAS DE LEITE  
E PRESENÇA DO GENE QUE CODIFICA METALOPROTEASE ALCALINA

**Tese 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: 26 de fevereiro de 2003

---

Prof<sup>a</sup>. Elza Fernandes de Araújo  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup>. Célia Alencar de Moraes  
(Conselheira)

---

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

---

Prof. Marcos Rogério Tótola

---

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

Aos meus pais Bolivar e Geralda,  
pelo amor, apoio e incentivo.

À Eliane,  
Pelo amor e carinho, e pela amizade, paciência, ajuda e compreensão.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus por ter me proporcionado inteligência e perseverança para vencer os obstáculos e pela presença insubstituível em cada instante da minha vida.

Aos meus pais, Bolivar e Geralda, pela vida, pelo amor, apoio, incentivo e pela dedicação que tornaram possível minha formação.

À Eliane pelo carinho, companheirismo e amor que foram indispensáveis a cada momento e que amenizaram as dificuldades encontradas no caminho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realização do Curso e pelo auxílio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, pelo estímulo, por sua valiosa colaboração e especialmente, pela amizade.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pelas críticas e valiosas sugestões na discussão e organização deste trabalho e pela disponibilidade do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos.

À professora Célia Alencar de Moraes, pelo entusiasmo, pelas valiosas sugestões e pelo estímulo constante.

Aos professores Hilário Cuquetto Mantovani e Marcos Rogério Tótola, pelo incentivo, pelas críticas e sugestões.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pelo estímulo e pelas discussões e ajuda que foram de grande importância na execução deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia.

À indústria de laticínios onde foram coletadas as amostras de leite.

À Fundação Oswaldo Cruz e a Fundação André Tozello pela doação das culturas de referência que foram fundamentais para o controle dos experimentos.

A todos os amigos, companheiros de Curso e de laboratório, representados por Maurício, Agenor, Eliseth, Cristiane, Denise, Jorge, Gildete, João Batista, Michele, Elizângela, Simone, Francis, Íris e Cida e tantos outros aqui não citados, pela amizade, pelo apoio e pela agradável convivência, fundamentais para que eu pudesse crescer tanto pessoal quanto profissionalmente.

À Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pelo isolamento das culturas utilizadas neste trabalho, pelas sugestões durante o desenvolvimento dos experimentos e pela amizade.

Ao Rodrigo Barros Rocha pelo auxílio na construção dos dendrogramas e pela amizade.

À Patrícia pela ajuda na tradução do Abstract da Tese para o inglês.

Ao meu tio e padrinho Luís Tadeu, pela amizade, apoio, incentivo e pela presença em todos os momentos.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e do BIOAGRO, pela amizade e serviços prestados.

À Aparecida, Laura e Nilcéia, pelo auxílio constante e pela amizade.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional e, em especial, a toda minha família.

## **BIOGRAFIA**

Maurilio Lopes Martins, filho de Bolivar Martins de Miranda e Geralda Lopes Martins, nasceu em Rio Pomba, Minas Gerais no dia 19 de julho de 1974.

Em setembro de 1996, graduou-se como Tecnólogo em Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. No período de 1996 a 2000 foi funcionário do Departamento de Garantia da Qualidade da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo (Leite Paulista).

Em outubro de 2000, retornou para a UFV onde iniciou o curso de graduação em Tecnologia de Laticínios, graduando-se em 2001.

Em agosto de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Bactérias utilizadas.....	12
3.2. Extração do DNA total.....	15
3.2.1. Isolados Gram-negativos.....	15
3.2.2. Isolados Gram-positivos.....	16
3.3. DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD).....	16
3.4. Análise dos dados.....	17
3.5. Avaliação da presença do gene <i>apr</i> pela Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	18
3.5.1. Determinação da eficiência de amplificação.....	18

	Página
3.5.2. Determinação da presença do amplificado do gene <i>apr</i> nos isolados de psicrotróficos proteolíticos.....	18
3.6. Determinação do limite de detecção de <i>P. fluorescens</i> em leite por PCR.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Diversidade genética dos isolados psicrotróficos proteolíticos.....	21
4.2. Eficiência de amplificação da mistura de preparações de DNA.....	32
4.3. Amplificação do DNA dos isolados psicrotróficos proteolíticos por PCR.....	37
4.4. Limite de detecção de <i>P. fluorescens</i> inoculadas no leite por PCR.....	41
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## RESUMO

MARTINS, Maurilio Lopes, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Diversidade de Bactérias Psicrotróficas Proteolíticas de Leite e Presença do Gene que Codifica Metaloprotease Alcalina.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Célia Alencar de Moraes.

A diversidade genética entre 113 culturas de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de amostras de leite cru granelizado foi avaliada utilizando-se a técnica de RAPD. Foi constatada uma grande diversidade genética entre os isolados, indicando fontes de contaminação diversas. A presença do gene *apr*, que codifica metaloproteases termorresistentes, foi avaliada por PCR em 26 culturas controle e em 133 isolados psicrotróficos proteolíticos de leite cru resfriado e granelizado. Detectou-se a presença do amplificado do gene *apr* apenas nas culturas de referência *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e estirpes de *P. aeruginosa* ATCC 15442 e ATCC 27853. A presença do gene *apr* foi detectada na mistura de DNA dos isolados psicrotróficos proteolíticos que apresentaram características fenotípicas de espécies do gênero *Pseudomonas*, quais sejam, Gram-negativas, não fermentadoras, catalase e oxidase positivas. Os demais isolados Gram-negativos e os Gram-positivos, embora tenham apresentado atividade proteolítica, não apresentaram o amplificado do gene *apr*. A técnica de PCR permitiu identificar a

presença de população acima de  $10^5$  UFC/mL de *P. fluorescens* inoculada em leite desnatado reconstituído após a extração do DNA total das bactérias. Entretanto, quando amostras de leite pasteurizado inoculado com populações variando de  $10^5$  a  $10^8$  UFC/mL foram analisadas por PCR, sem a etapa de extração do DNA total, o limite de detecção foi de  $10^8$  UFC/mL.

## ABSTRACT

MARTINS, Maurilio Lopes, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February, 2003.

**Diversity of Proteolytic Psychotrophic Bacteria of Milk and Presence of the Gene that Codes for Alkaline Metalloprotease.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee Members: Elza Fernandes de Araújo and Célia Alencar de Moraes.

The genetic diversity of 113 cultures of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from raw milk collected from cooling tanks was analyzed by RAPD. A great genetic diversity was detected among these isolates indicating different sources of contamination. The presence of the *apr* gene, which codes a heat-resistant metalloprotease, was assessed by PCR in 26 type strains and in 136 proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from raw milk. The presence of the *apr* gene was only detected in *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 and, strains of *P. aeruginosa* ATCC 15442 and ATCC 27853. The *apr* gene was detected in total DNA extracted from proteolytic psychrotrophics that showed phenotypic characteristics belonging to *Pseudomonads* such as Gram-negative, non-fermentative, positive-catalase and positive-oxidase. The *apr* gene was not detected in the other Gram-negative and Gram-positive isolates studied although they have displayed proteolysis. The PCR technique identified the presence of *Pseudomonas fluorescens* when total DNA was extracted from skim milk previously inoculated with a bacterial population containing  $10^5$  CFU/mL. However, the detection limit of *apr* gene without the DNA extraction step was  $10^8$  CFU/mL in pasteurized milk.

## 1. INTRODUÇÃO

A manutenção e o transporte do leite cru sob refrigeração eliminam a deterioração do leite por bactérias mesofílicas, mas resulta na seleção de bactérias psicotróficas, que são aquelas capazes de se multiplicarem a 7°C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento.

Dentre os psicotróficos, o gênero *Pseudomonas*, que inicialmente representa menos de 10% da microbiota do leite recém-ordenhado, é um importante agente de deterioração do leite cru, pois possui tempo de geração reduzido a temperaturas de refrigeração. Muitas espécies de *Pseudomonas* produzem proteases termorresistentes que hidrolisam a  $\alpha$ ,  $\kappa$  e  $\beta$ -caseína, resultando em alterações na textura, rendimento e na qualidade sensorial do leite e derivados. Algumas delas também produzem lecitinase e enzimas lipolíticas, que contribuem consideravelmente, para a deterioração de produtos lácteos.

A alternativa utilizada para determinar a presença da microbiota psicotrófica proteolítica em leite e derivados é a contagem do número de psicotróficos viáveis em ágar padrão. O método oficial recomenda condições de incubação a 7°C por 7 a 10 dias e o método alternativo estima a microbiota após incubação por 25 horas, a 21°C. Esses métodos microbiológicos convencionais, além de demorados não apresentam correlação satisfatória com o potencial de deterioração do leite e derivados. A presença das proteases no leite pode ser avaliada por métodos imunológicos, a exemplo da técnica de ELISA, que detecta a presença dessas enzimas quando o número de células é alto.

Métodos mais rápidos, precisos e sensíveis necessitam ser desenvolvidos a fim de se detectar a microbiota psicotrófica proteolítica presente no leite, uma vez que as metodologias disponíveis não permitem obter informação sobre a qualidade microbiológica do produto antes do seu processamento.

O gene *apr* codifica metaloproteases alcalinas termoresistentes e é encontrado em uma gama de bactérias proteolíticas, tais como, *P. fluorescens*, *P. tolaasii*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* sp, *Serratia marcescens* e *Serratia* sp e em espécies de *Flavobacterium* e *Cytophaga* provenientes de amostras do solo.

A avaliação do uso da PCR para verificar a presença do gene *apr* entre isolados psicotróficos proteolíticos de leite cru refrigerado e granelizado foi um dos objetivos do presente trabalho. A diversidade genética desses isolados também foi avaliada, utilizando a técnica de RAPD.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O leite, ao ser secretado pelo animal, é livre de microrganismos, mas, a presença de contaminação externa na superfície do úbere e tetas permite o acesso de microrganismos ao leite, mesmo quando a ordenha é conduzida de maneira asséptica (RYSER, 1999). A diversidade desses contaminantes iniciais é limitada e mais comumente constituída por micrococos, lactococos e *Corynebacterium bovis* (RYSER, 1999). Contaminações adicionais ocorrem a partir de água, solo, esterco, alimentação animal, equipamentos de ordenha e manipuladores (COUSIN, 1982; RYSER, 1999). A variedade dessas fontes de contaminação permite que uma grande diversidade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos contaminem o leite, mas são as bactérias que dominam a população.

As condições de estocagem e transporte em tanques refrigerados promovem uma mudança na microbiota contaminante do leite cru de predominantemente Gram-positiva para Gram-negativa. As bactérias Gram-negativas geralmente compreendem mais de 90% da população microbiana do leite cru resfriado que é, primariamente, composta por psicotróficos e coliformes (RYSER, 1999). Psicotróficos são aqueles microrganismos capazes de multiplicarem a 7°C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento (FRANK et al., 1992). No leite, essa microbiota Gram-negativa é representada principalmente, por espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e

*Flavobacterium* spp. (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). As bactérias Gram-positivas compreendem menos de 10% do total das bactérias do leite cru refrigerado e incluem bactérias lácticas e formadoras de esporos, ambos contaminantes ambientais (RYSER, 1999). As bactérias lácticas estão representadas por espécies de *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (RYSER, 1999), enquanto as formadoras de esporos incluem espécies de *Bacillus* e *Clostridium* (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). Segundo MARTIN (1981), bactérias aeróbias formadoras de esporos estão presentes em, praticamente, todo leite cru em números menores do que  $10^3$  UFC/mL. Espécies de *Bacillus*, principalmente *B. licheniformis* e *B. cereus*, compreendem cerca de 95% dessa microbiota.

Segundo WIEDMANN et al. (2000), os psicrotróficos contribuem para a deterioração do leite de duas formas distintas: primeiro, produzem a maioria das enzimas proteolíticas e lipolíticas que são secretadas no leite cru durante a estocagem antes do processamento. Muitas dessas enzimas podem resistir ao processo de pasteurização rápida, conduzido a 72°C por 15 segundos e, até mesmo, ao tratamento de esterilização comercial, o processo com ultra-alta temperatura – UAT que utiliza temperaturas entre 138°C a 149°C por 2 a 10 segundos. A atividade remanescente dessas enzimas pode reduzir a qualidade sensorial e a vida-de-prateleira dos produtos lácteos fluidos processados. Segundo, a contaminação pós-pasteurização ocorre por vários tipos de microrganismos, principalmente *Pseudomonas* spp, que causam a deterioração do leite pasteurizado, durante a estocagem sob refrigeração, sendo que essa contaminação ocorre, principalmente, em razão das condições de envase do leite pasteurizado, que não é conduzido de forma asséptica (ENEROTH et al., 2000a; WIEDMANN et al., 2000).

Dentre as bactérias psicrotróficas, o gênero *Pseudomonas* representa menos de 10% da microbiota do leite recém-ordenhado. No entanto, esse grupo é um importante agente de deterioração do leite cru refrigerado (ENEROTH et al., 2000a) pois, entre os psicrotróficos proteolíticos, são os que possuem o menor tempo de geração a temperaturas compreendidas entre 0°C e 7°C (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). ADAMS et al. (1975) mostraram que 70 a 90% dos psicrotróficos isolados de leite cru estocado a 4°C por uma semana eram *Pseudomonas*. ENEROTH et al. (2000a) verificaram que espécies de

*Pseudomonas* constituíram de 72 a 77% dos isolados obtidos em amostras de leite cru, leite pasteurizado e amostras de ambientes de indústrias de laticínios. Entretanto, nem toda estirpe de *Pseudomonas* spp. é igualmente capaz de produzir enzimas como proteases, lipases e lecitinases, que promovem a deterioração do leite (WIEDMANN et al., 2000; DOGAN e BOOR, 2003). Em produtos lácteos refrigerados, *P. fluorescens* é a espécie mais comumente encontrada (COUSIN, 1982) e está mais freqüentemente associada com defeitos sensoriais embora outras espécies, como *P. fragi*, *P. putida* e *P. aeruginosa* também sejam comumente encontradas (WIEDMANN et al., 2000; DOGAN e BOOR, 2003). KOHLMANN et al. (1991) verificaram que, entre seis isolados psicotróficos de leite, *P. fluorescens* e *P. fragi* produziram maiores quantidades de proteases extracelulares. A avaliação de 66 isolados de *Pseudomonas* provenientes de leite cru e processado indicou que 58%, 58% e 47% eram proteolíticos, lipolíticos e produtores de lecitinase, respectivamente (WIEDMANN et al., 2000). Nesse estudo, os isolados foram identificados como predominantemente, *P. fluorescens* e *P. putida* e foram separados em cinco grupos, baseando-se em características fenotípicas. Desses cinco grupos, apenas representantes de dois deles apresentaram atividades de enzimas extracelulares com potencial de deterioração do leite refrigerado. DOGAN e BOOR (2003) identificaram 338 isolados de leite como *Pseudomonas*, dos quais 51% eram *P. fluorescens*. Esses autores verificaram que 69% das estirpes de *P. fluorescens* produziram enzimas proteolíticas, lipolíticas e lecitinase, enquanto 87,5% das estirpes de *P. putida* não apresentaram atividade dessas enzimas hidrolíticas.

SØRHAUG e STEPANIAK (1997) destacaram características importantes das proteases secretadas por *P. fluorescens* como: temperatura ótima de ação entre 30 e 45°C; atividade significativa a 4°C; pH ótimo próximo da neutralidade; são metaloenzimas contendo um átomo de zinco e até oito átomos de cálcio, que conferem estabilidade térmica à molécula e apresentam tempo de redução decimal (D) de atividade a 140°C de 50 a 200 segundos. Esse grau de estabilidade térmica é surpreendente, considerando que essas enzimas são produzidas e ativas na temperatura de refrigeração. Outra propriedade surpreendente dessas enzimas, também destacada por esses autores, é a sua susceptibilidade a autodegradação entre 55 e 60°C, sendo que esse fenômeno de inativação é altamente dependente do pH.

Essas enzimas hidrolisam a  $\alpha$ -caseína, mas algumas têm preferência por  $\alpha_1$  e  $\beta$ -caseína, sendo que nenhum sítio de clivagem específico foi ainda encontrado (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). A temperatura ótima para produção das proteases por *Pseudomonas* spp. psicrótrófica é menor do que a temperatura ótima para o seu crescimento. Quantidades elevadas de proteases são produzidas mesmo a temperaturas próximas a 5°C, e a síntese é induzida por vários peptídios de baixa massa molecular provenientes da degradação de proteínas.

Considerando que as enzimas produzidas por bactérias psicrótróficas são responsáveis pelos defeitos de qualidade do leite e derivados, a atividade desses organismos no leite precisa ser controlada, para assegurar a qualidade dos produtos lácteos. Como a temperatura de refrigeração adotada no armazenamento do leite não inibe o crescimento de psicrótróficos nem a produção e atividade de enzimas deterioradoras, é imprescindível que se assegure a adoção das boas práticas de produção (BMP) para limitar a contaminação. Uma outra alternativa para minimizar os danos causados por essa microbiota é o controle do tempo de estocagem do leite cru. Para URAZ e ÇITAK (1998), o tempo de estocagem do leite cru não deve ultrapassar o período de 24 horas após o recebimento pela indústria de laticínios. A Resolução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002) estabelece que o leite deve ser refrigerado a 4°C ou menos, até três horas após a ordenha e mantido a temperatura de conservação de 7°C na propriedade rural ou no tanque comunitário e a 10°C no estabelecimento processador. A Instrução Normativa nº 51 do mesmo ministério estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento que vai beneficiá-lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser no máximo de 48 horas, independente do seu tipo e recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas.

A manutenção do leite cru refrigerado por períodos maiores, como três a quatro dias antes de ser processado, pode assegurar tempo suficiente para o crescimento de microrganismos como *P. fluorescens* e outros psicrótróficos que podem alcançar populações de  $10^3$  a  $10^6$  UFC/mL (KOHLMANN et al., 1991). Proteases têm sido detectadas em leite com essa população de psicrótróficos (COUSIN, 1982). Entretanto, a contaminação elevada por psicrótróficos não indica a presença de enzimas microbianas associadas à perda de qualidade e

redução de vida útil dos produtos lácteos. A presença de uma contaminação baixa por psicotróficos também não é uma garantia da qualidade do leite. ADAMS et al. (1975) detectaram proteases termorresistentes com  $D_{149^{\circ}\text{C}}$  de 90 segundos em amostras de leite estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$  e, nessas amostras, a contagem padrão de psicotróficos variou de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL.

Os testes de predição da vida útil de produtos lácteos são baseados na detecção de psicotróficos Gram-negativos, especialmente de *Pseudomonas*, porque essas bactérias causam a vasta maioria dos problemas de conservação desses produtos (WHITE, 1993). Entretanto, os métodos disponíveis recomendam incubação por 7 a 10 dias a  $7^{\circ}\text{C}$  (FRANK et al., 1992). Os métodos convencionais de cultivo e quantificação da contaminação microbiana são considerados demorados e não compatíveis com os requerimentos para atender a um controle de qualidade eficiente na indústria de laticínios (GARDEA et al., 2002). Uma variação da técnica convencional de contagem de psicotróficos foi estabelecida pela Federação Internacional de Laticínios (IDF, 1991) e preconiza a incubação por 25 horas, a  $21^{\circ}\text{C}$ . Esses métodos que utilizam incubação preliminar das amostras de leite antes do plaqueamento e incubação geralmente são finalizados após 24 horas (BISHOP e WHITE, 1989; WHITE, 1993). As desvantagens dessas metodologias, convencional e estimativa, são a inviabilidade do direcionamento do leite, em tempo hábil, para o processamento e a ausência de relação entre as populações de microrganismos psicotróficos e a atividade proteolítica (COUSIN, 1982). Por isso, esses procedimentos de plaqueamento, precedidos ou não de incubação preliminar, têm baixa correlação com a vida útil real dos produtos lácteos (WHITE, 1993). Os resultados obtidos por DUYVESTYEN et al. (2001) permitiram concluir que a contagem padrão em placas não é uma opção válida para a determinação da qualidade sensorial do leite pasteurizado. Esses autores constataram uma correlação muito baixa entre a contagem de psicotróficos aeróbios e avaliação sensorial do produto. Portanto, as desvantagens associadas à técnica de contagem padrão em placas comprometem uma característica desejável para a garantia de qualidade na indústria de laticínios, que é a capacidade de prever rapidamente a vida-de-prateleira dos seus produtos finais.

Métodos mais rápidos, precisos e seguros necessitam ser desenvolvidos a fim de se detectar a microbiota psicotrófica proteolítica presente no leite, uma vez que as metodologias disponíveis não fornecem informação sobre a qualidade

microbiológica do produto antes do seu processamento (OEHLRICH e MCKELLAR, 1983).

A presença das enzimas proteolíticas no leite pode ser avaliada por métodos imunológicos, a exemplo da técnica de ELISA, mas que detecta a presença de protease somente quando o número de células de *Pseudomonas* é acima de  $10^6$  UFC/mL (MATTA et al., 1997). Além disso, algumas espécies de bactérias produzem proteases imunologicamente não relacionadas e pode ocorrer da taxa de atividade antigênica ser diferente da atividade proteolítica residual (BIRKELAND et al., 1985; MATTA et al., 1997).

Outra alternativa a ser avaliada é a técnica de amplificação de uma seqüência específica do DNA, conhecida como Reação de polimerase em cadeia-PCR. A PCR tem sido usada para a detecção e identificação de muitos microrganismos em amostras de alimentos, solo, material clínico, entre outros (MALORNY et al., 2002) e causou uma verdadeira revolução na pesquisa biológica, que busca o entendimento de processos biológicos fundamentais, bem como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da reação de polimerase em cadeia tornaram-na particularmente poderosa para estudos genéticos envolvendo grande número de indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Essa técnica tem sido utilizada para a detecção de várias espécies bacterianas como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e bactérias formadoras de esporos como *Bacillus* e *Clostridium* (OLSEN et al., 1995).

As desvantagens da PCR são a impossibilidade de se distinguir células vivas e mortas, a presença de inibidores de polimerase nas amostras de alimentos, levando a resultados falsos negativos e o acesso ao microrganismo alvo. O pré-enriquecimento antes da análise supera muitos desses problemas. A inibição da PCR pode ser evitada pela separação das bactérias da mistura de alimento por centrifugação diferencial antes da extração do DNA. A eficiência da lise celular pode ser aumentada por tratamento enzimático da célula antes da purificação do DNA alvo (BOER e BEUMER, 1999).

Entre as técnicas de tipagem baseadas em PCR, a de RAPD – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso é a mais usada para a caracterização de bactérias. A metodologia de RAPD baseia-se na técnica de PCR, porém utiliza

oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias e de pequenos tamanhos (9 ou 10 bases), além de uma temperatura menor de pareamento e uma composição de G+C dos oligonucleotídeos igual ou superior a 50% (WILLIAMS et al., 1990). Essas características permitem que esses oligonucleotídeos pareiem em certas regiões do genoma, gerando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos que podem ser separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados na forma de uma banda sob luz ultravioleta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

O polimorfismo detectado no tamanho dos fragmentos amplificados pode ser atribuído a vários fatores, incluindo a substituição de nucleotídeos que cria ou elimina um sítio de ligação do oligonucleotídeo, deleção, inserção ou inversão nesse sítio de pareamento e ainda, grandes inserções que separam sítios de pareamento, tornando-os grandes demais para serem amplificados (CAETANO-ANOLLÉS e BASSAM, 1993).

Os marcadores RAPD apresentam uma série de vantagens, visto que nenhum dado sobre a seqüência do DNA é necessário (MATIOLI, 2001). É uma técnica simples, rápida e que não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse, uma vez que um único conjunto de oligonucleotídeos pode ser usado para qualquer organismo. Além disso, uma quantidade mínima de DNA é necessária para a análise genotípica de um indivíduo. Por se basear em PCR, é muito mais sensível na detecção de polimorfismo em nível de DNA, o que a torna uma técnica eficiente para a identificação de genótipos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Além disso, a técnica de RAPD também é adequada para a obtenção de mapas genéticos (MATIOLI, 2001) e é satisfatória para agrupar estirpes de microrganismos.

Como todos os tipos de marcadores, o RAPD também possui algumas limitações como o baixo conteúdo de informação genética por loco. Além disso, algumas bandas são de fácil interpretação, enquanto outras são ambíguas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Uma desvantagem dessa metodologia é a falta de reprodutibilidade entre laboratórios. As fontes de variabilidade são a concentração de oligonucleotídeos, a quantidade e qualidade do DNA alvo, a concentração e a fonte da Taq polimerase, MgCl<sub>2</sub>, o termociclador e o número de ciclos (BOER e BEUMER, 1999).

A técnica RAPD pode ser utilizada na área de microbiologia ambiental e de alimentos para detectar e identificar patógenos, assim como na tipificação epidemiológica de isolados e análise de populações (GIRAFFA e NEVIANI, 2001). ENEROTH et al. (2000a) traçaram rotas de contaminação de leite cru e pasteurizado por bactérias Gram-negativas em indústrias de laticínios por meio de PCR-RAPD. Esses autores encontraram os mesmos padrões de RAPD em isolados provenientes de amostras de leite pasteurizado e de empacotadoras e bicos de envase. Nenhum isolado de leite cru apresentou o mesmo padrão de RAPD dos isolados de leite pasteurizado. Entretanto, um isolado do tanque de estocagem de leite pasteurizado apresentou o mesmo padrão de RAPD dos isolados encontrados no ar em torno do tanque de estocagem e das máquinas de envase. A tipagem por RAPD também evidenciou isolados Gram-negativos de padrões idênticos no leite pasteurizado, na água de resfriamento e na água de condensação nas envasadoras (ENEROTH et al. 2000b).

Outros métodos genotípicos, como a ribotipagem, também têm sido adotados como alternativas para discriminar espécies de Gram-negativos e *Pseudomonas* isoladas de leite, de produtos lácteos e de ambiente de indústrias de laticínios. DOGAN e BOOR (2003) reconheceram 42 diferentes ribotipos entre 81 isolados de *Pseudomonas* provenientes de leite, produtos lácteos e ambientes de indústrias de laticínios.

Os métodos de subtipagem molecular podem identificar diferentes estirpes dentro de uma espécie, gerando dados úteis para propósitos taxonômicos ou epidemiológicos. Métodos baseados em ácidos nucleicos têm a vantagem sobre métodos de identificação fenotípica por não serem influenciados pelas condições ambientais. O conhecimento de variabilidade das estirpes e espécies presentes torna-se necessário para determinar a vida útil de leite e de produtos lácteos. Além disso, a tipagem molecular pode auxiliar na determinação das fontes de contaminação do leite.

As técnicas moleculares são uma excelente ferramenta para detecção, identificação e caracterização de microrganismos encontrados em vários ambientes e alimentos, mas, infelizmente, o estudo da biodiversidade microbiana é ainda limitado pela dificuldade de identificação e caracterização dos microrganismos sem que seja feito o seu isolamento em cultura pura. Essas

limitações restringem e influenciam o conhecimento da diversidade microbiana (GIRAFFA e NEVIANI, 2001).

Em 1998, WIDMER et al. adotaram um protocolo de PCR baseado no gene rRNA 16S para a detecção seletiva do gênero *Pseudomonas* em amostras ambientais. Os resultados obtidos indicaram que os oligonucleotídeos utilizados foram seletivos e altamente específicos para *Pseudomonas*, e representam uma poderosa ferramenta para confirmação taxonômica dos microrganismos pertencentes a esse gênero. Em 2001, BACH et al. utilizaram um conjunto de oligonucleotídeos e sondas funcionais para a detecção dos genes que codificam proteases em bactérias proteolíticas originárias do solo baseando-se na seqüência de DNA dos genes que codificam metaloprotease alcalina (*apr*), metaloprotease neutra (*npr*) e serina protease (*sub*). Naquele estudo, bactérias proteolíticas isoladas do solo foram investigadas quanto ao seu potencial proteolítico utilizando as técnicas de PCR e de hibridização com as sondas APR, NPR e SUB, que hibridizaram, especificamente, com os fragmentos de DNA do gene correspondente. Os genes *sub* e *npr* foram encontrados principalmente em espécies do gênero *Bacillus*, enquanto o gene *apr* foi encontrado em *P. fluorescens*, *P. tolaasii*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* sp, *Erwinia chrysanthemi*, *Serratia marcescens* e *Serratia* sp e em espécies de *Flavobacterium* e *Cytophaga*.

Segundo COUSIN (1982), espécies do gênero *Pseudomonas* representam as principais bactérias Gram-negativas proteolíticas isoladas do leite e derivados. Um método simples, rápido, relativamente barato e reproduzível, como a PCR, seria de grande ajuda, não só para a detecção dos genes codificadores das proteases produzidas por microrganismos psicotróficos no leite, em curto período de tempo, como também em estudos sobre ecologia e diversidade genética desses microrganismos possibilitada pela técnica RAPD.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

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

#### **3.1 – Bactérias utilizadas**

As espécies de bactérias psicrotróficas produtoras de proteases extracelulares, isoladas a partir de leite cru granelizado e refrigerado, foram obtidas e caracterizadas fenotipicamente no Laboratório de Microbiologia de Alimentos DMB/UFV por PINTO (2003)<sup>1</sup>. Os isolados foram agrupados ao acaso, conforme suas características de produção de oxidase, catalase, capacidade de fermentação da glicose e coloração de Gram (Quadro 1).

Como culturas de referência, foram usadas as espécies psicrotróficas proteolíticas e não proteolíticas e mesófilas proteolíticas e não proteolíticas (Quadro 2). Os estoques das culturas usadas foram mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  em caldo tripticaseína e soja (TSB) acrescido de 0,6% de extrato de levedura e 20% de glicerol.

---

1 – Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto: Estudante de Doutorado do Departamento de Microbiologia da UFV.

Quadro 1 – Características fenotípicas e agrupamentos dos isolados psicotróficos proteolíticos obtidos a partir de leite cru refrigerado e granelizado

<b>Características</b>	<b>Grupos</b>	<b>Isolados</b>
Gram-negativos, fluorescentes, não fermentadores, catalase e oxidase positiva	1	7A, 7B, 13, 15, 23, 25, 26, 29, 31, 32
	2	33, 34, 40, 41, 42, 43, 50, 51, 54, 55
	3	56, 64, 65, 72, 77, 79, 84, 94, 95, 96
	4	97, 100, 101, 102, 107, 110, 111, 112, 113, 116
	5	118, 123, 124, 128, 136, 137, 138A, 139, 140, 141
	6	1, 3, 49, 92, 99, 115, 126, 142, 146, 148
Gram-negativos, fermentadores, catalase positiva e oxidase negativa	7	4, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 30, 38
	8	39, 49, 53, 58, 59, 60, 61, 63, 67, 68
	9	70, 71, 74, 78, 83F, 86, 87, 88, 91, 93
	10	80, 108, 109, 143, 144, 145
Gram-positivos	11	2, 11, 35, 76, 82A, 82B, 105, 121, 134, 135
	12	8, 16, 44, 52, 114, 119, 120, 122, 133A
	13	10, 12, 14, 62, 66, 69, 90, 129, 150
	14	46, 48, 81, 89, 90, 104, 127, 131B, 132, 151

No início de cada experimento, os isolados foram estriados em ágar Caseinato Padrão – SMCA (FRANK et al., 1992) e incubados a 26°C por 18 horas. Após o crescimento, uma colônia de cada isolado de bactéria Gram-negativa foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 20 mL de caldo nutriente que foi incubado a 26°C por 14 horas. Uma colônia de bactéria Gram-positiva foi transferida para 10 mL de caldo infusão de cérebro e coração - BHI (Merck) que foi incubado a 26°C por 18 horas. Cada isolado foi ativado por duas vezes consecutivas antes da realização dos experimentos.

Quadro 2 – Relação das culturas controle usadas para a detecção do fragmento do gene *apr*

Cultura	Referência	Proteólise 26 a 37°C	7°C por 10 dias	
			Crescimento	Proteólise
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	+	+	+
<i>Aeromonas</i> sp	ATCC 35941	+	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 23858	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	+	+	-
<i>Flavobacterium odoratum</i>	ATCC 4651	+	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 367	+	+	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 7469	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	+	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12692	+	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 8100	+	+	+
<i>Achromobacter cycloclastes</i>	ATCC 21921	-	+	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	ATCC 8750	-	+	-
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	ATCC 13138	-	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 1347	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	+	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCT 0182/CIP79.32	-	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014	-	+	-
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 7468	-	+	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	ATCC 25238	-	-	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	ATCC 14909	-	+	-
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 15175	-	+	-

## 3.2 – Extração do DNA total

### 3.2.1 – Isolados Gram-negativos

O DNA total dos isolados e das culturas de referência Gram-negativas foi obtido conforme procedimento padrão descrito por MARMUR (1961), com modificações. Após ativação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 2.300 g, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 600  $\mu$ L de solução salina-EDTA, constituída de 0,15 M de NaCl e 0,1 M de EDTA (ácido etileno diaminotetracético), pH 8,0. A suspensão foi novamente centrifugada por 10 minutos a 13.400 g, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 300  $\mu$ L de solução salina-EDTA. Foram adicionados 200  $\mu$ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 25%, homogeneizando-se com leve agitação, seguindo-se incubação da mistura a 60°C por 10 minutos. Após este tempo, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente, adicionada de 200  $\mu$ L de NaCl 5M e centrifugada a 13.400 g por 15 minutos. O sobrenadante foi removido para outro tubo de microcentrífuga e um volume igual de fenol-clorofórmio (1:1) foi adicionado para a desproteínização, homogeneizando-se levemente por 5 minutos e centrifugando-se, a seguir, por 10 minutos a 13.400 g. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo de microcentrífuga e adicionada de clorofórmio (1:1), homogeneizada levemente durante 5 minutos e novamente centrifugada por 10 minutos a 13.400 g.

A fase aquosa foi removida para outro tubo de microcentrífuga, adicionada de um volume de isopropanol gelado e misturado levemente. As amostras foram deixadas a -20°C por aproximadamente 14 horas e centrifugadas a 13.400 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70%, deixado secar a temperatura ambiente, sendo então ressuspensas em 25  $\mu$ L de tampão TE, constituído de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0, contendo 10  $\mu$ g de RNase. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos.

A concentração do DNA foi estimada por análise em gel de agarose a 0,8%, tendo como padrão uma amostra de DNA do bacteriófago lambda de quantidade conhecida. As amostras de DNA foram conservadas a -20°C.

### **3.2.2 – Isolados Gram-positivos**

Após ativação, as células dos isolados e culturas de referência Gram-positivas foram coletadas por centrifugação por 10 minutos a 13.400 *g* e maceradas com pistilo estéril. Volumes de 100  $\mu$ L do tampão de extração constituído de Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 5% foram adicionados e misturados com a suspensão de células por, aproximadamente, 30 segundos, para obtenção de uma suspensão homogênea. Foram acrescentados 400  $\mu$ L do tampão de extração e as amostras foram deixadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação por 10 minutos a 13.400 *g*, o sobrenadante foi removido para um outro tubo de microcentrífuga e um volume igual de fenol-clorofórmio (1:1) foi adicionado para a desproteinização, misturado com cuidado por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos a 13.400 *g*. A fase aquosa superior foi então transferida para outro tubo de microcentrífuga e adicionada de clorofórmio (1:1), homogeneizada levemente durante 5 minutos e novamente centrifugada por 10 minutos a 13.400 *g*. O sobrenadante foi removido para um outro tubo de microcentrífuga, adicionado de um volume igual de isopropanol gelado e misturado levemente. As amostras foram deixadas a -20°C por aproximadamente 14 horas e centrifugadas por 30 minutos a 13.400 *g*. O sedimento foi seco ao ambiente e ressuspenso em 25  $\mu$ L de tampão de extração (TE) constituído por Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0 e RNase na concentração de 10  $\mu$ g/  $\mu$ L e o DNA extraído. A quantidade de DNA foi estimada por análise em gel de agarose 0,8%, tendo como padrão uma amostra de DNA do bacteriófago lambda de quantidade conhecida.

### **3.3 – DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD)**

A diversidade genética dos isolados psicrotrofos proteolíticos de leite cru granelizado foi avaliada segundo procedimento citado por WILLIAMS, et al (1990).

As reações de amplificação do DNA foram feitas em um volume total de 25  $\mu$ L contendo tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, 0,1 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP - Promega®), 0,4

M do oligonucleotídeo iniciador - Operon®, uma unidade de Taq polimerase (Promega®) e, aproximadamente, 10 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em um termociclador “Programmable Thermal Controller PTC-100 – MJ Research Inc”, programado para 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Após o último ciclo, manteve-se uma etapa de 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação do DNA, foram adicionados, a cada amostra, 4  $\mu$ L de uma mistura contendo 0,25% de azul de bromofenol, 60% de glicerol e tampão TEB 1X constituído de Tris-HCl 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,0 e ácido bórico 89 mM. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio na concentração de 0,2  $\mu$ g/mL. O tampão utilizado foi TEB 1X e o tempo de corrida foi de, aproximadamente, 6 horas a 70 volts. O DNA do fago  $\lambda$  174, clivado com a enzima *Hae* III, foi utilizado como padrão de tamanho de bandas. Terminada a eletroforese, as imagens dos géis foram digitalizadas em sistema de vídeo Eagleye™ (Stratagene®).

### **3.4 – Análise dos dados**

Os dados obtidos foram tabulados, utilizando-se os códigos 1 ou 0, respectivamente, para a presença ou ausência de um determinado fragmento de DNA visualizado no gel.

O critério utilizado para formação dos grupos foi o da média das semelhanças entre todos os pares de itens que formam cada grupo. Os dados foram agrupados em um dendrograma, utilizando-se o método UPGMA (“Método de Agrupamento aos Pares Utilizando Médias Aritméticas”), com auxílio do programa “GENES” (CRUZ, 2001). O dendrograma, ao ser construído, separou os isolados em grupos, atribuindo-se o valor de 100% à maior semelhança encontrada entre eles. Cada grupo por sua vez, foi dividido em outros subgrupos, cujas semelhanças foram sempre determinadas pela maior semelhança existente entre os indivíduos que os compõem.

### **3.5 – Avaliação da presença do gene *apr* pela reação de polimerização em cadeia (PCR)**

#### **3.5.1 – Determinação da eficiência de amplificação**

Como controle positivo da presença do gene *apr*, utilizou-se o DNA extraído de *P. fluorescens* (ATCC 1352) analisado em quantidades de 5 ng a 50 ng. Controles negativos incluíram o DNA extraído de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 1347), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*. Alíquotas de 10  $\mu$ L do DNA extraído dos controles negativos foram misturadas e analisadas na presença ou não do DNA de *P. fluorescens*. Culturas de referência de várias espécies bacterianas (Quadro 2) foram avaliadas quanto à presença do gene *apr*.

As reações de amplificação do DNA foram feitas em um volume total de 25  $\mu$ L, contendo tampão Tris- HCl 10 mM pH 8,0; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM; 0,1 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 25 pmol de cada oligonucleotídeo, uma unidade de Taq DNA polimerase (Promega®) e, aproximadamente, 5 ng de DNA. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram as seguintes: (I) 5'TAYGGBTTC AAYTCCAAYAC3' e (II) 5'VGCGATSGAMACRTTRCC3' (BACH *et al.*, 2001), sintetizadas pela Invitrogen®.

#### **3.5.2. Determinação da presença do amplificado do gene *apr* nos isolados de psicrotróficos proteolíticos**

As reações de amplificação do DNA foram feitas com grupos de 10 preparações do DNA, extraído dos isolados avaliados. O DNA de cada isolado foi quantificado para que fosse feita a padronização da quantidade de DNA a ser utilizada na mistura (10 ng/  $\mu$ L). Foram misturados em um tubo Eppendorf, 5  $\mu$ L de cada preparação de DNA e foi retirado 2,5  $\mu$ L do volume final de 50  $\mu$ L para ser utilizado na reação de amplificação. A presença do amplificado indicou que um ou mais dos 10 isolados analisados possuíam o gene *apr*. Os isolados de um grupo positivo e um grupo negativo para a presença do amplificado na mistura foram analisados individualmente. Em um grupo negativo, a reação de PCR foi

repetida com a adição da preparação de um DNA de *P. fluorescens*, comprovadamente portadora do gene *apr*.

As amplificações ocorreram em um termociclador “PTC 100” (MJ Research, Inc.), programado para 30 ciclos, sendo cada ciclo constituído da seguinte seqüência tempo/temperatura: um minuto a 94°C, trinta segundos a 55°C e vinte segundos a 72°C, com subsequente redução da temperatura para 15°C, permanecendo assim até a retirada das amostras.

Finalizada a amplificação, as amostras foram analisadas em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

### **3.6 – Determinação do limite de detecção de *P. fluorescens* em leite por PCR**

Alíquotas de 10 mL contendo  $10^9$  UFC/mL de *P. fluorescens* foram inoculadas em 90 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 12%, a fim de simular a contaminação da matéria-prima com  $10^3$  a  $10^8$  UFC/mL e de se determinar o limite de detecção da técnica de PCR proposta.

Após a inoculação e homogeneização de *P. fluorescens* no LDR, alíquotas foram coletadas para a determinação do número de células viáveis em ágar Caseinato Padrão – SMC, após incubação a 25°C por 24 horas. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 g, o sobrenadante foi desprezado e as bactérias foram ressuspensas em 600 L de solução salina-EDTA. O procedimento para extração do DNA total foi realizado conforme descrito anteriormente.

A análise do gene *apr* por PCR também foi conduzida em leite pasteurizado inoculado com *P. fluorescens*, em população variando entre  $10^5$  e  $10^8$  UFC/mL, sem a etapa de extração do DNA total. A contagem do número de células viáveis foi realizada conforme descrito anteriormente, imediatamente após a inoculação.

Após a inoculação de *P. fluorescens* no leite pasteurizado, esse foi centrifugado a fim de se obter o sedimento de células, que foram lavadas por três vezes em solução salina 0,85% e ressuspensas em solução salina 0,85% para serem utilizadas na análise por PCR.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA extraído apresentou-se com rendimento satisfatório quando analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, como exemplificado na Figura 1. Esse DNA foi considerado adequado para a utilização nas reações de RAPD e de PCR.

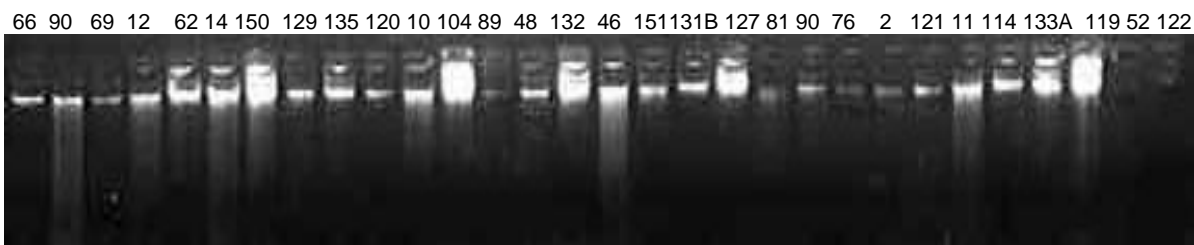


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA extraídas dos isolados psicotróficos proteolíticos Gram-positivos de leite cru refrigerado e granelizado. Os números indicados correspondem aos isolados relacionados no Quadro 1.

#### 4.1 – Diversidade genética dos isolados psicrotróficos proteolíticos

Os três oligonucleotídeos utilizados neste trabalho geraram 88 fragmentos de DNA polimórficos com tamanhos variando de 194 a 3.530 pares de base (pb) e uma média de 29 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo (Quadro 3). Nenhum fragmento monomórfico foi observado para os isolados Gram-negativos. Para os isolados Gram-positivos, foram obtidos 66 fragmentos de DNA, todos polimórficos, ou seja, estavam presentes ou ausentes em pelo menos um dos isolados considerados. A média do número de fragmentos de DNA analisados foi de 22 por oligonucleotídeo, com tamanhos variando de 234 a 3.530 pb (Quadro 3). Em avaliação da diversidade genética de psicrotróficos Gram-negativos isolados de leite e de ambientes da indústria de laticínios, ENEROTH et al. (2000a) observaram de 9 a 15 bandas distintas com tamanho entre 100 e 2.200 pb. Esses autores concluíram que a diversidade entre os padrões de bandas foi grande e deveu-se a uma grande variedade de fontes de contaminação.

Quadro 3 - Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e número de fragmentos polimórficos e monomórficos encontrados na reação de RAPD com 113 isolados de psicrotróficos proteolíticos.

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' - 3')	Número de fragmentos polimórficos	Número de fragmentos monomórficos	Faixa de tamanho dos fragmentos (pb)
Gram-negativos				
OPM 01	GTTGGTGGCT	29	---	194 – 3530
OPAA 10	TGGTCGGGTG	36	---	271- 3530
OPAA 16	GGAACCCACA	23	---	234 – 1353
Total		88	---	233 – 2804
Gram-positivos				
OPM 01	GTTGGTGGCT	19	---	310 – 3530
OPAA 10	TGGTCGGGTG	24	---	234 – 3530
OPAA 16	GGAACCCACA	23	---	234 – 3530
Total		66	---	259 – 3530

Os resultados das ampliações utilizando o oligonucleotídeo OPAA-10 são mostrados nas Figuras 2 e 3.

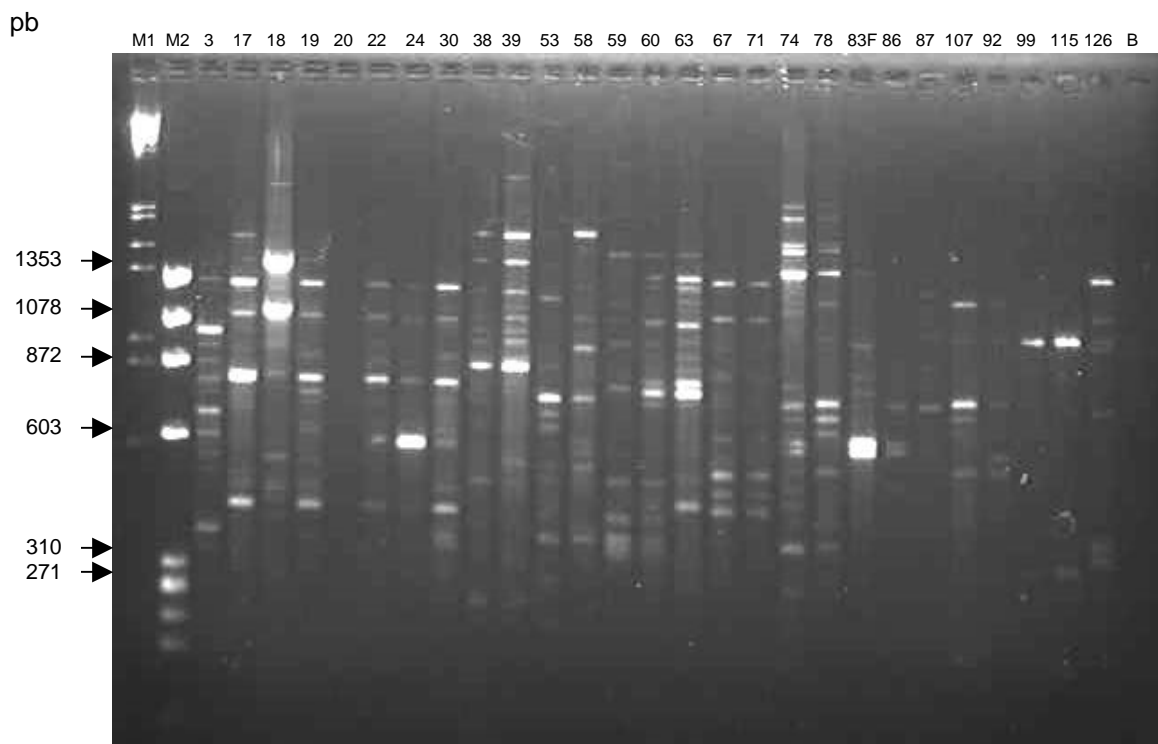


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de DNA amplificado de psicotróficos proteolíticos Gram-negativos isolados de amostras de leite cru e granelizado. As bandas foram amplificadas utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador OPAA-10. Os números indicados correspondem aos isolados relacionados no Quadro 1 e M1 e M2 correspondem ao DNA do bacteriófago lambda clivado com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III e ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III, respectivamente.

Com base nos dados de presença e ausência dos fragmentos amplificados, as semelhanças genéticas entre os pares de isolados foram calculadas e apresentadas em quatro matrizes (Quadro 4, 5, 6 e 7). Foi possível observar que as semelhanças entre os 40 isolados Gram-negativos não fermentadores e entre *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 situaram-se entre 1 e 88% (Quadro 4). Os 40 isolados Gram-negativos fermentadores apresentaram

semelhanças genéticas que variaram entre 2 e 89% (Quadro 5). As semelhanças genéticas entre os 25 isolados Gram-positivos catalase positiva situaram-se entre 4 e 100% (Quadro 6) e entre os seis Gram-positivos catalase negativa, situaram-se entre 10 e 67% (Quadro 7). Os isolados Gram-negativos que apresentaram maiores semelhanças genéticas foram provenientes de uma mesma amostra de leite cru refrigerado e granelizado. Os resultados apresentados demonstram a grande diversidade genética entre os isolados. Outros autores concluíram também, por meio de tipagens fenotípicas e moleculares, que a variabilidade entre os contaminantes do leite cru e pasteurizado é muito grande (WIEDMANN et al. 2000; ENEROTH et al., 2000a; 2000b.; DOGAN e BOOR, 2003).

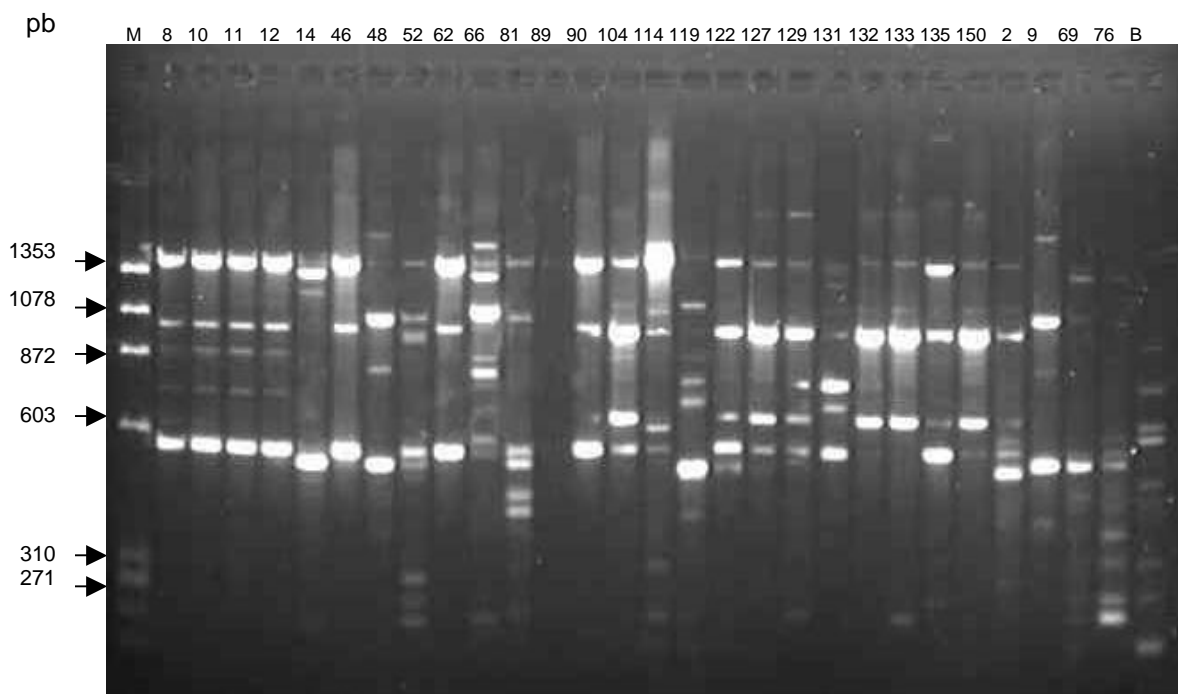


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de DNA amplificado de psicrotróficos proteolíticos Gram-positivos isolados de amostras de leite cru granelizado. As bandas foram amplificadas utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador OPAA-10. Os números indicados correspondem aos isolados relacionados no Quadro 1 e M corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III e B corresponde a mistura de reação sem a presença do DNA, respectivamente.





Quadro 6 – Matriz de semelhanças genéticas (%) entre os isolados psicrotróficos proteolíticos, Gram-positivos, catalase positiva isolados de amostras de leite cru e granelizado analisadas duas a duas. Os isolados são identificados pelos números na linha superior e na coluna esquerda da matriz e suas características fenotípicas estão descritas no Quadro 1.

26

	8	10	11	12	14	46	48	52	66	81	104	114	119	127	129	131B	132	133A	135	150	2	9	69	76	121	
8	100																									
10	91	100																								
11	92	83	100																							
12	100	91	92	100																						
14	9	10	14	9	100																					
46	82	73	75	82	10	100																				
48	7	8	7	7	25	8	100																			
52	22	24	28	22	20	25	18	100																		
66	13	13	12	13	16	9	20	17	100																	
81	24	25	29	24	17	26	13	18	15	100																
104	18	19	23	18	17	20	17	30	11	25	100															
114	20	21	25	20	24	22	8	33	7	22	56	100														
119	13	13	17	13	16	14	14	29	10	19	11	12	100													
127	22	23	26	22	11	24	15	22	10	23	60	36	14	100												
129	21	22	26	21	9	24	8	28	8	23	42	32	17	45	100											
131B	14	15	14	14	13	16	7	20	7	22	27	24	21	20	32	100										
132	12	13	16	12	15	13	15	22	14	14	45	30	10	70	38	15	100									
133A	14	14	18	14	17	15	17	14	11	16	45	29	7	63	37	17	63	100								
135	39	41	44	39	23	44	8	39	11	32	45	35	25	41	30	17	29	27	100							
150	21	22	20	21	9	24	9	10	8	17	35	25	4	45	33	19	38	53	30	100						
2	24	25	29	24	12	26	14	37	15	25	36	33	29	33	29	22	28	26	38	29	100					
9	29	24	28	29	14	33	44	22	13	18	18	20	4	12	10	20	12	9	25	15	18	100				
69	21	22	26	21	32	24	18	35	12	23	50	39	17	32	14	19	21	24	44	20	35	28	100			
76	22	24	28	22	14	25	8	29	13	24	24	20	17	22	15	9	12	14	39	15	30	16	44	100		
121	20	15	25	20	18	22	31	26	7	22	33	24	16	25	19	8	15	23	29	19	27	26	39	26	100	

Quadro 7 – Matriz de semelhanças genéticas (%) entre os isolados psicrotrofos proteolíticos, Gram-positivos, catalase negativa isolados de amostras de leite cru granelizado analisadas duas a duas. Os isolados são identificados pelos números na linha superior e na coluna esquerda da matriz e suas características fenotípicas estão descritas no Quadro 1.

	62	89	90	120	151	122
62	100					
89	29	100				
90	62	33	100			
120	11	29	10	100		
151	33	67	40	14	100	
122	47	60	44	10	40	100

A similaridade entre os grupos formados de isolados Gram-negativos, não fermentadores foi baixa (Figura 4) e, nesses grupos, estavam as espécies de *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. ENEROTH et al (2000a) também detectaram valores de semelhança genética abaixo de 20% entre 10 grupos de isolados de leite cru e pasteurizado, de água e ar de uma indústria de laticínios, na maioria desses grupos, havia isolados que foram identificados como *P. fluorescens*, *P. corrugata* e *P. putida*.

Valores baixos de semelhança genética também foram observados entre os isolados Gram-negativos fermentadores (Figura 5), Gram positivos catalase positiva (Figura 6) e Gram-positivos catalase negativa (Figura 7).

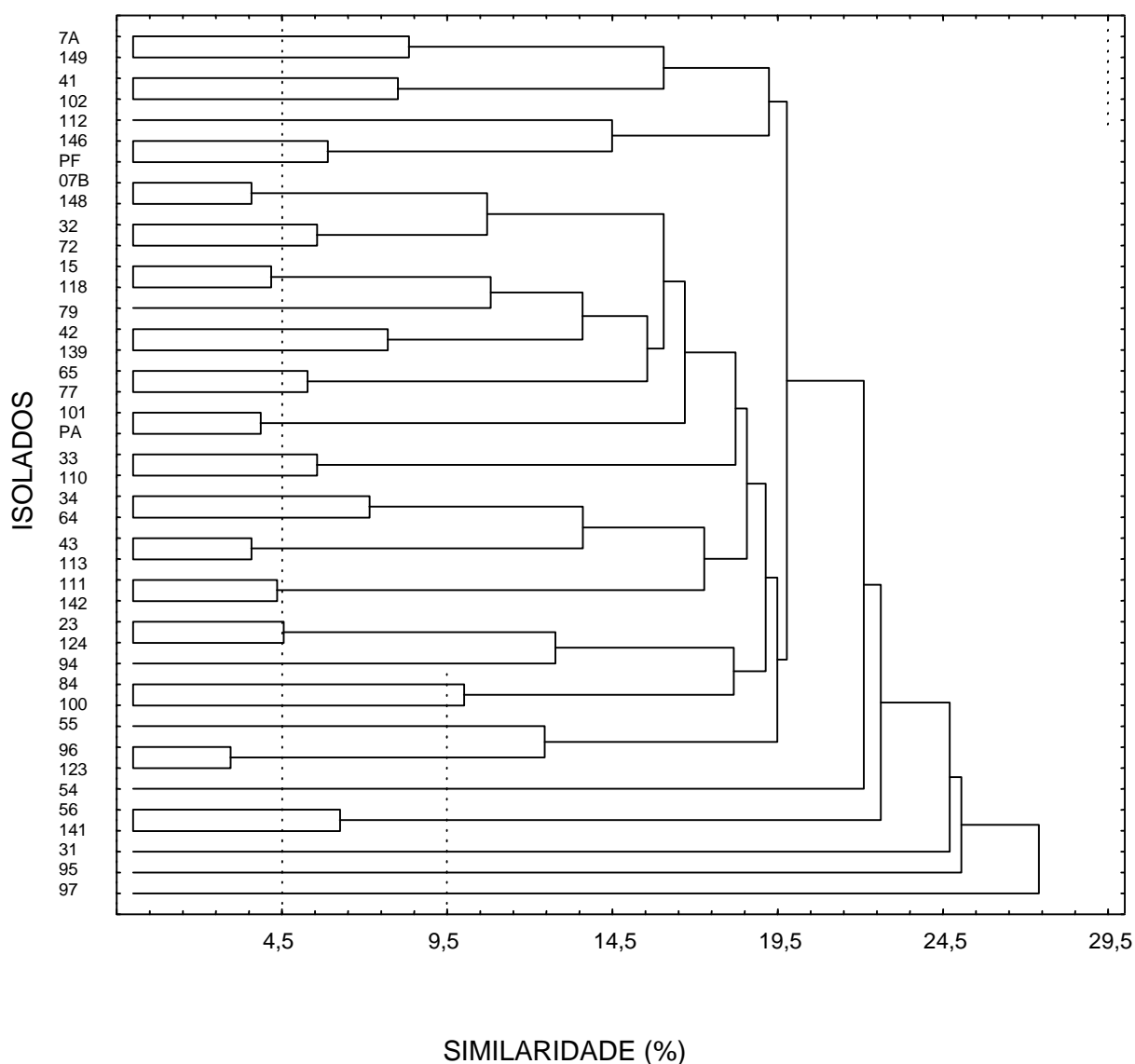


Figura 4 – Dendrograma gerado pelo agrupamento dos genótipos de isolados psicotróficos proteolíticos Gram-negativos, não fermentadores isolados de leite cru refrigerado a partir da matriz de semelhanças genéticas (Quadro 4).

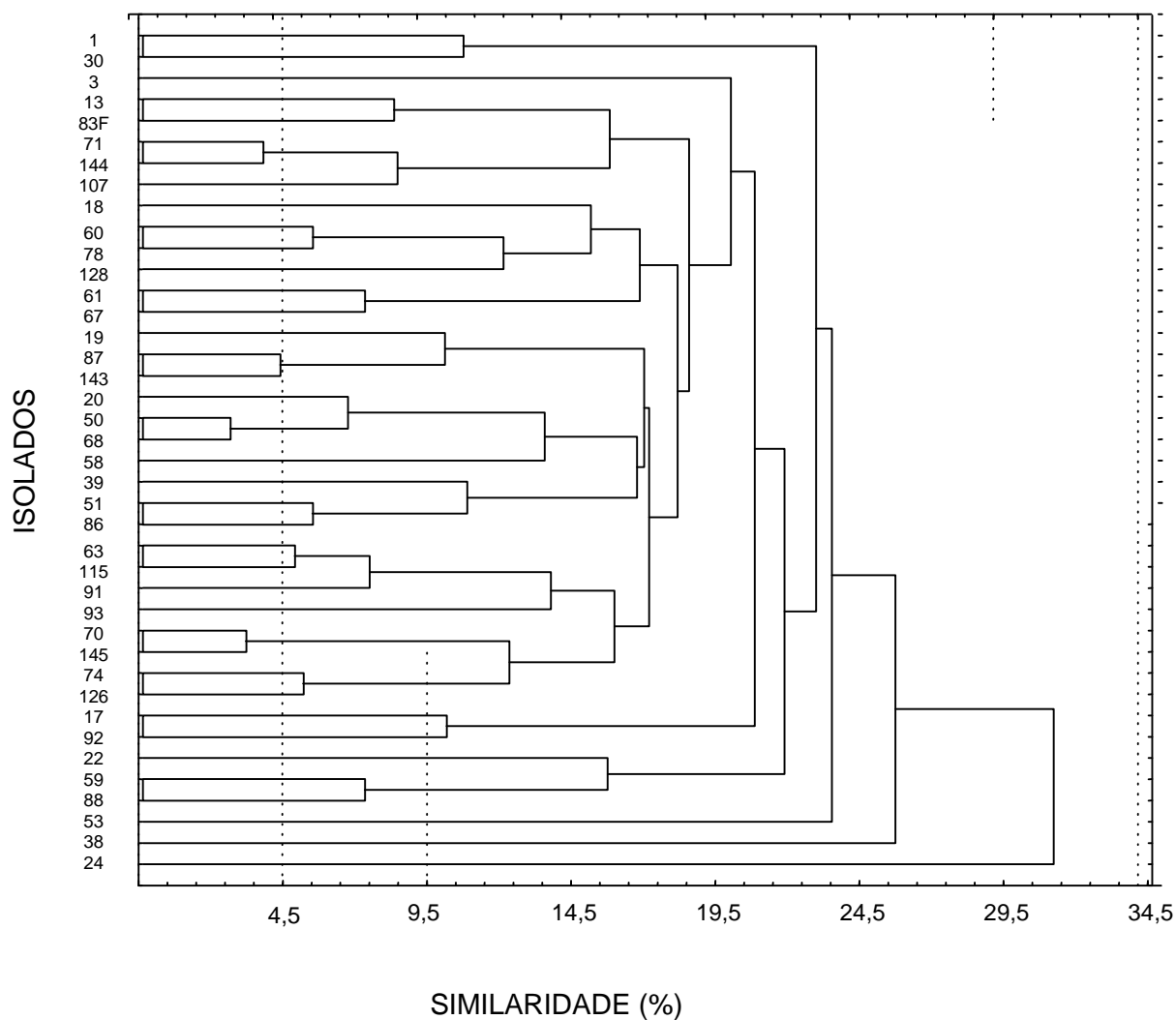


Figura 5 – Dendrograma gerado pelo agrupamento dos genótipos de isolados psicrotróficos proteolíticos Gram-negativos, fermentadores isolados de leite cru refrigerado a partir da matriz de semelhanças genéticas (Quadro 5).

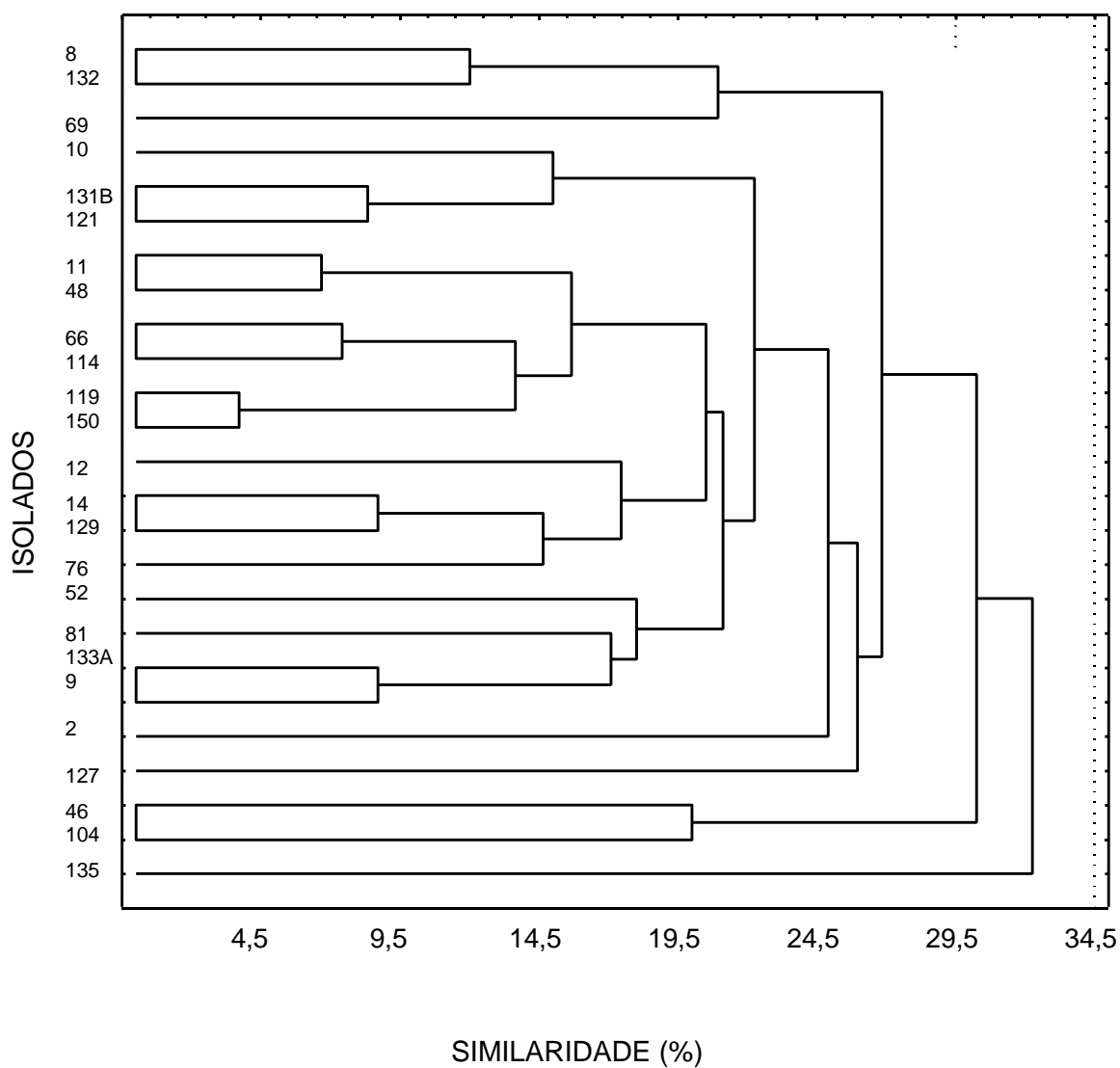


Figura 6 – Dendrograma gerado pelo agrupamento dos genótipos de isolados psicrotróficos proteolíticos Gram-positivos, catalase positiva isolados de leite cru refrigerado a partir da matriz de semelhanças genéticas (Quadro 6).

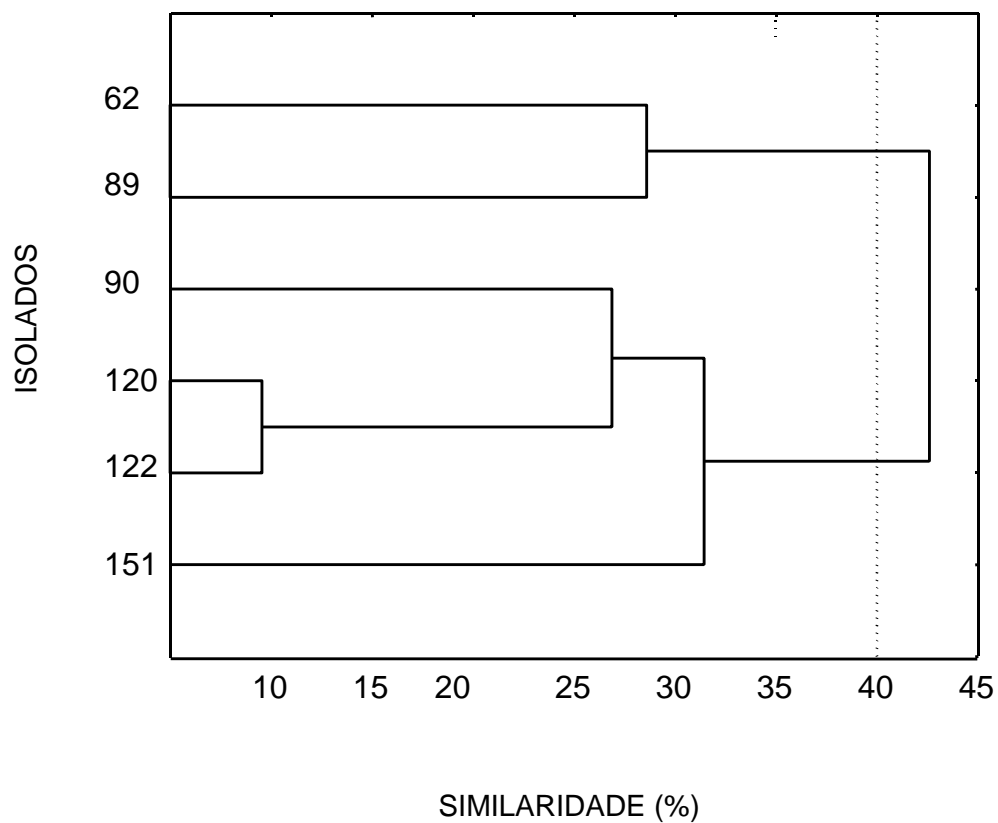


Figura 7 – Dendrograma gerado pelo agrupamento dos genótipos de isolados psicrotróficos proteolíticos Gram-positivos, catalase negativa isolados de leite cru refrigerado a partir da matriz de semelhanças genéticas (Quadro 7).

## 4.2 – Eficiência de amplificação da mistura de preparações de DNA

A preparação do DNA de *P. fluorescens* ATCC 13525 foi utilizada como controle positivo em todas as reações de amplificação. Esse DNA foi analisado em gel 0,8% em diferentes quantidades (Figura 8) e a quantificação foi feita utilizando padrões de DNA de quantidades conhecidas.

As amplificações na PCR não foram influenciadas pela quantidade de DNA presente na reação, ou seja, a amplificação foi eficiente em diferentes quantidades de DNA de *P. fluorescens* (Figura 9). Verificou-se que, mesmo quando o DNA estava presente em quantidades não visualizadas no gel, como 5 ng e 10 ng (Figura 8), foi possível constatar o produto da amplificação do DNA (Figura 9). Quantidades de até 50 ng amplificaram com a mesma eficiência que quantidades 10 vezes menores (Figura 9). A presença do gene *apr* em *Pseudomonas* foi relatada por BACH et al. (2001) e, além de estar presente em estirpes de *P. fluorescens*, *P. tolaasii*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., esse gene também foi constatado em *Erwinia chrysanthemi*, *Serratia marcescens* e *Serratia* sp.

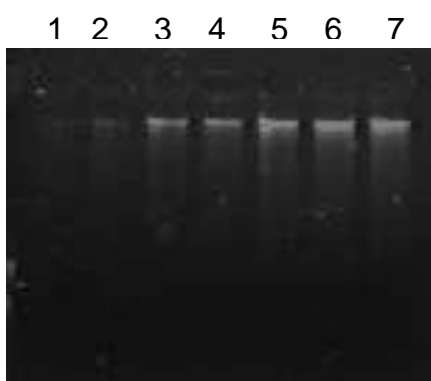


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da preparação de DNA de *P. fluorescens* ATCC 13525 em diferentes quantidades estimadas de DNA. Os números correspondem à, 1 - 5ng/ L, 2 - 10ng/ L, 3 - 20ng/ L, 4 - 25ng/ L, 5 - 30ng/ L, 6 - 40 ng/ L e 7 - 50ng/ L, respectivamente.

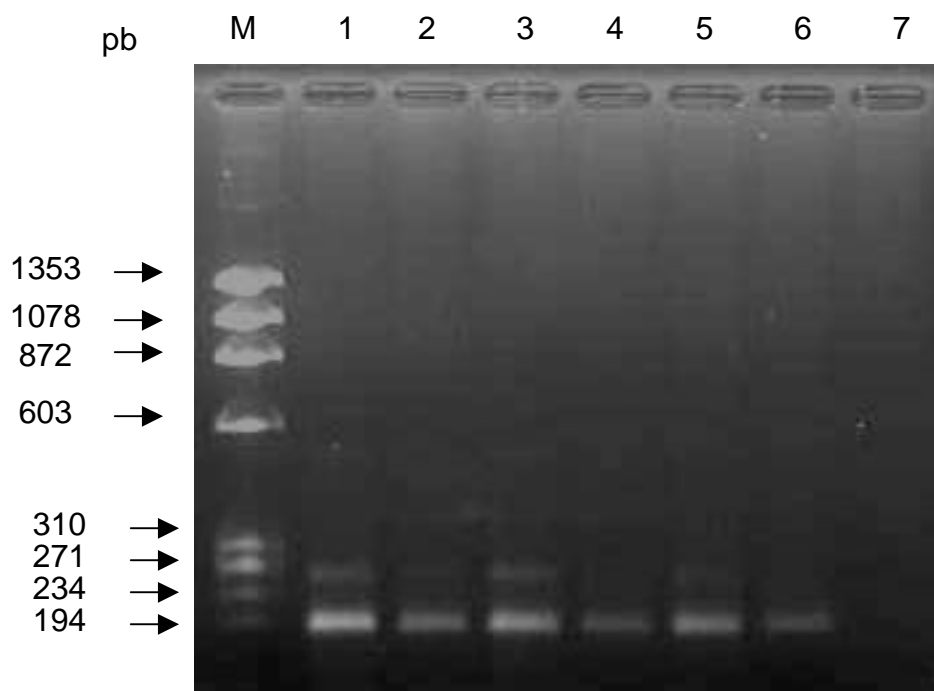


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amostras de DNA de *P. fluorescens* ATCC 13525 a partir de diferentes quantidades de DNA. Os números correspondem, às ampliações das quantidades estimadas de 1 - 5ng/ L, 2 - 10ng/ L, 3 - 20ng/ L, 4 - 30ng/ L, 5 - 40ng/ L, 6 - 50ng/ L, respectivamente e o número 7 corresponde a mistura de reação sem a presença do DNA. “M” corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

Não foi constatada a presença do amplificado do gene *apr* quando se analisou o DNA de *E. coli*, *E. cloacae*, *A. hydrophila*, *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis* (Figura 10), comprovando a especificidade da reação. BACH et al. (2001) também não detectaram o gene *apr* em *E. coli* e em bactérias Gram-positivas, assim como em membros do gênero *Bacillus*.

Quando o DNA extraído de *P. fluorescens* ATCC 13525, portador do gene *apr*, foi adicionado à mistura contendo preparações de DNA dos cinco organismos que, comprovadamente, não apresentaram a amplificação do fragmento de DNA do gene *apr* nas condições de PCR adotadas, verificou-se que a amplificação ocorreu (Figura 10). Este resultado indicou que, mesmo estando em pequenas quantidades e em misturas com DNA de outros organismos, o gene *apr* pode ser detectado.

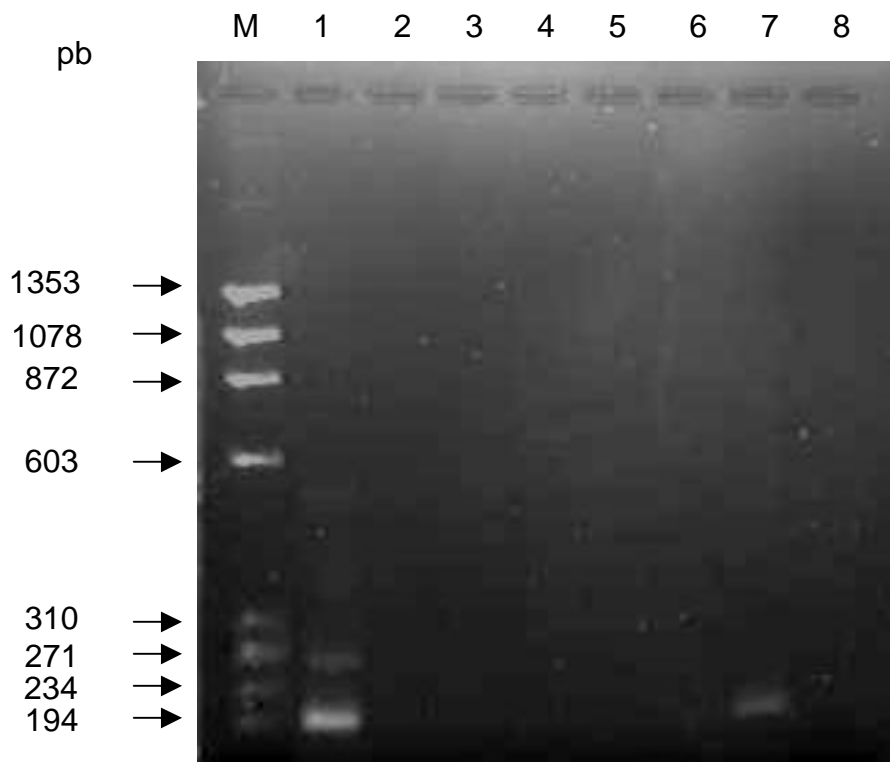


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR de preparações de DNA de diferentes organismos. Os números correspondem a 1 - *P. fluorescens* ATCC 13525, 2 - *E. coli* ATCC 25922, 3 - *E. cloacae* ATCC 1347, 4 - *A. hydrophila* ATCC 7966, 5 - *Eucalyptus urophylla* e 6 - *E. grandis*, respectivamente. O número 7 corresponde à mistura contendo preparações de DNA de *P. fluorescens*, *E. coli*, *E. cloacae*, *A. hydrophila*, *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis* e o número 8 corresponde à mistura de reação sem a presença do DNA. “M” corresponde ao DNA do fago X 174 clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

A avaliação das 26 culturas de referência usadas (Quadro 2) indicou a presença do gene *apr* apenas em *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *Serratia marcescens* (Figura 11 e 12). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por BACH et al. (2001) e esses autores verificaram que em outras bactérias isoladas do solo, como várias espécies de *Bacillus* e em *E. coli*, o gene não foi

detectado, embora muitas das espécies analisadas apresentassem atividade proteolítica.

*Flavobacterium odoratum* ATCC 4651 não apresentou o fragmento de 194 pares de base do gene *apr* (Figura 11), embora tenha demonstrado atividade proteolítica à 30°C. Entretanto, BACH et al (2001) detectaram o fragmento de DNA do gene *apr* em bactérias do complexo *Flavobacterium-Cytophaga*. Essas bactérias foram identificadas como bacteróides pertencentes ao filo *Flavobacterium-Cytophaga* utilizando-se a hibridização do DNA com uma sonda específica para o gene rRNA 16S.

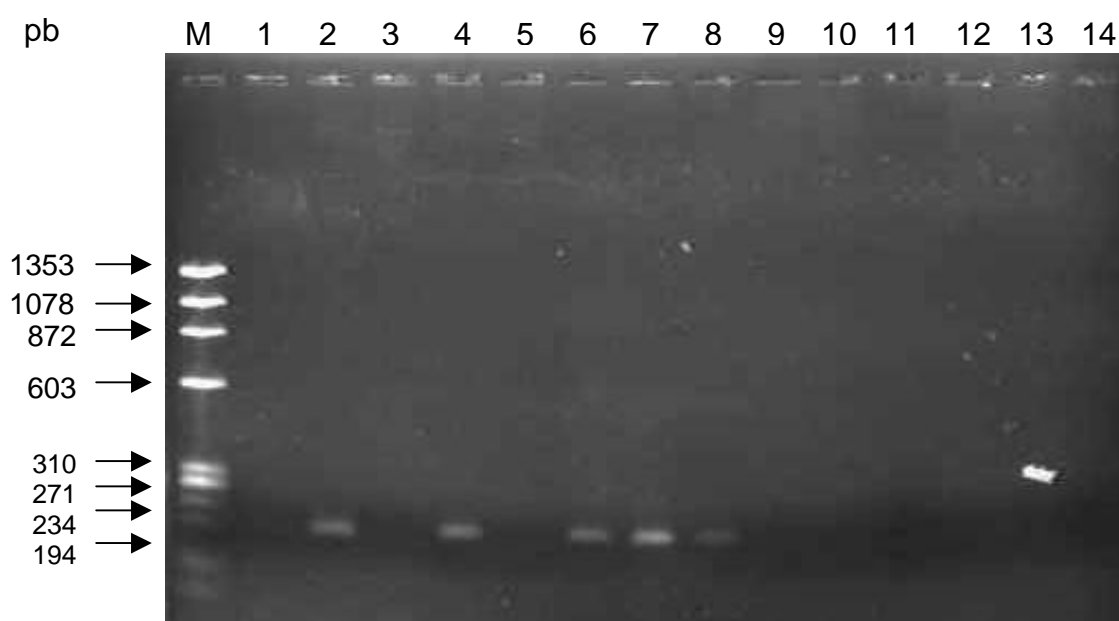


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR de preparações de DNA das culturas controle positivo (proteolíticas). Os números correspondem a 1 - *Flavobacterium odoratum*, 2 - *Serratia marcescens*, 3 - *Aeromonas* sp, 4 - *Pseudomonas aeruginosa*, 5 - *Streptococcus agalactiae*, 6 - *Pseudomonas fluorescens*, 7 - *Pseudomonas fluorescens*, 8 - *Pseudomonas aeruginosa*, 9 - *Staphylococcus aureus*, 10 - *Bacillus cereus*, 11 - *Bacillus subtilis*, 12 - *Citrobacter freundii*, 13 - *Lactobacillus casei* e 14 - *Aeromonas hydrophila*, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

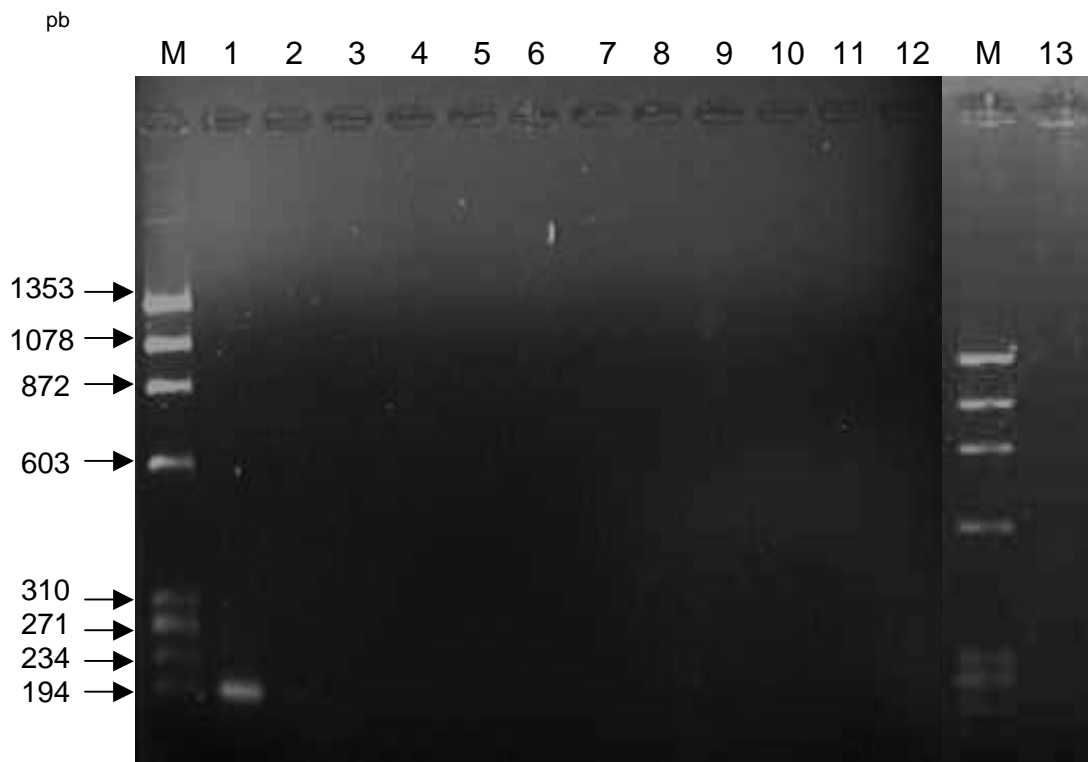


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR de preparações de DNA das culturas controle negativo (não proteolíticas). Os números correspondem a 1 - *Pseudomonas fluorescens*, 2 - *Achromobacter cycloclastes*, 3 - *Alcaligenes xylosoxydans*, 4 - *Enterobacter aerogenes*, 5 - *Klebsiella oxytoca*, 6- *Micrococcus luteus*, 7 - *Lactobacillus plantarum*, 8 - *Pseudomonas alcaligenes*, 9 - *Pseudomonas putida*, 10 - *Moraxella catarrhalis*, 11 - *Escherichia coli*, 12 - *Enterobacter cloacae* e 13 - *Alcaligenes faecalis*, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

### 4.3 – Amplificação do DNA dos isolados psicotróficos proteolíticos por PCR

A amplificação do fragmento de 194 pares de base do gene *apr* foi observada nos grupos de um a seis que continham as preparações de DNA de 10 isolados psicotróficos proteolíticos Gram-negativos (Figuras 13 e 14). Os 60 isolados que constituíram esses seis grupos apresentaram as características fenotípicas de não fermentadores, catalase e oxidase positivas que são características encontradas em espécies de *Pseudomonas*. Embora os isolados Gram-negativos, fermentadores, catalase positiva e oxidase negativa constituintes dos grupos de sete a 10, tenham se apresentado como proteolíticos, a análise por PCR não detectou a presença do fragmento de DNA do gene *apr* (Figura 14).

O fragmento de DNA amplificado, que corresponde a uma parte do gene *apr*, também não foi observado nos isolados pertencentes aos grupos de 11 a 14, constituídos por psicotróficos, proteolíticos e Gram-positivos (Quadro 1). Nesses grupos, provavelmente, estão presentes bactérias do gênero *Bacillus* e representantes de bactérias lácticas, que podem apresentar outros genes que codificam diferentes enzimas proteolíticas. Em muitas espécies de *Bacillus*, a presença dos genes *npr*, que codifica para metaloproteases neutras e *sub*, que codifica para serina peptidases, foi detectada (BACH et al., 2001).

A análise individual dos isolados componentes do grupo três, positivo para a presença do gene *apr*, evidenciou que seis, dos 10 isolados, possuíam o fragmento de DNA de 194 pb específico para a metaloprotease alcalina (Figura 15). Este resultado indicou que é possível detectar a presença de bactérias produtoras de metaloprotease alcalina numa preparação de DNA de vários indivíduos. A análise do DNA dos isolados do grupo nove, negativo para a presença do gene *apr*, Resultou em ausência do amplificado (Figura 16).

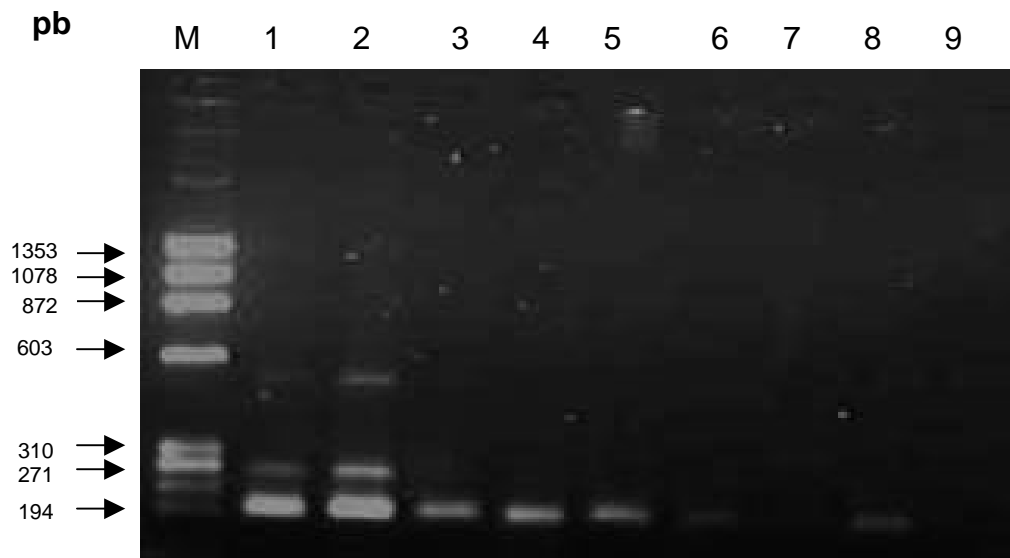


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR da preparação de DNA dos diferentes grupos. Os números correspondem a 1 - *Pseudomonas fluorescens*, 2 - Grupo 2, 3 - Grupo 3, 4 - Grupo 4, 5 - Grupo 6, 6 - Grupo 5, 7 - Grupo 9, 8 - DNA da mistura controle e 9 - mistura de reação sem a presença do DNA, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III.



Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR do DNA dos isolados de diferentes grupos. Os números correspondem a 1 - *Pseudomonas fluorescens*, 2 - *Escherichia coli*, 3 - DNA da mistura controle, 4 - Grupo 1, 5 - Grupo 8, 6 - Grupo 10, 7 - Grupo 11, 8 - Grupo 12, 9 - Grupo 13, 10 - Grupo 14 e 11 - Grupo 7, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III

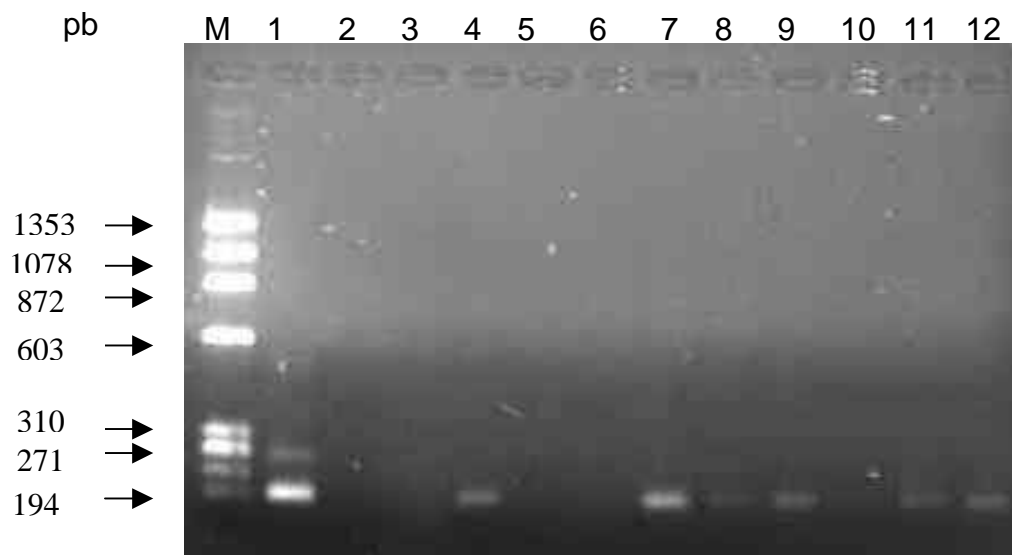


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR da preparação de DNA dos isolados do grupo três (positivo). Os números correspondem a 1 - *Pseudomonas fluorescens*, 2 - *Escherichia coli*, 3 - isolado 56, 4 - isolado 64, 5 - isolado 65, 6 - isolado 72, 7 - isolado 77, 8 - isolado 79, 9 - isolado 84, 10 - isolado 94, 11 - isolado 95 e 12 - isolado 96, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae III*.

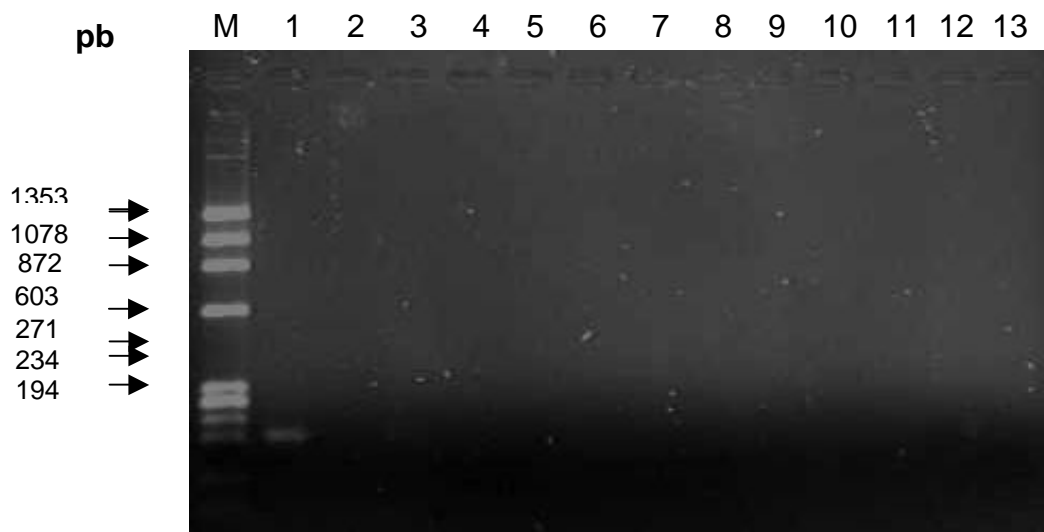


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR da preparação de DNA dos isolados do grupo nove (negativo). Os números correspondem a 1 - *Pseudomonas fluorescens*, 2 - *Escherichia coli*, 3 - isolado 70, 4 - isolado 71, 5 - isolado 74, 6 - isolado 78, 7 - isolado 83F, 8 - isolado 86, 9 - isolado 87, 10 - isolado 88, 11 - isolado 91, 12 - isolado 93 e 13 - mistura de reação sem a presença do DNA, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

#### 4. 4 - Limite de detecção de *P. fluorescens* inoculada no leite por PCR

Quando o DNA de *P. fluorescens* inoculado em LDR foi extraído e analisado por PCR, foi possível detectar a presença do amplificado quando a população de células variou de  $2,4 \times 10^5$  a  $1,6 \times 10^8$  UFC/mL (Figura 17). Considerando que a PCR é reconhecida como uma técnica sensível e capaz de detectar um número baixo de microrganismos na amostra, evidencia-se a necessidade de uma melhor adequação dessa metodologia, particularmente na etapa de extração do DNA do leite. Segundo RAMESH et al. (2002), PCR é uma técnica extremamente útil para culturas microbianas puras, mas tem sua eficiência reduzida quando conduzida diretamente com amostras de alimentos. O ponto crítico, segundo esses autores, é a preparação da amostra e, no leite, a

presença de gordura e outras substâncias pode comprometer a qualidade do DNA extraído. A modificação nos passos de extração do DNA total de *Yersinia enterocolitica* inoculada no leite, utilizando uma combinação de solventes orgânicos, detergentes e álcalis permitiu aumentar a sensibilidade com a detecção de 10 UFC/mL (RAMESH et al., 2002).

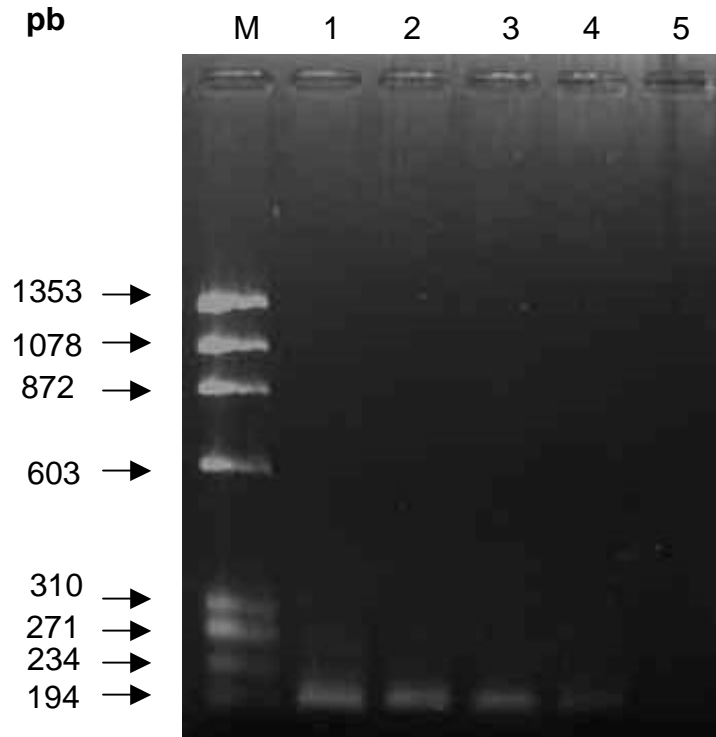


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR da preparação de DNA de diferentes inóculos de *Pseudomonas fluorescens* no leite em pó desnatado reconstituído 12%. Os números correspondem a 1 -  $1,6 \times 10^8$  UFC/mL, 2 -  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL, 3 -  $2,5 \times 10^6$  UFC/mL, 4 -  $2,4 \times 10^5$  UFC/mL e 5 -  $2,8 \times 10^4$  UFC/mL, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

Quando a PCR foi conduzida com amostras de leite pasteurizado inoculadas com *P. fluorescens* sem a extração do DNA, a presença do amplificado foi verificada apenas na amostra inoculada com, aproximadamente,  $1,7 \times 10^8$  UFC/mL (Figura 18). Esta baixa sensibilidade da PCR nas condições utilizadas pode ser atribuída ao preparo da amostra. Segundo GRANT et al. (2000), o leite é conhecido como um substrato inibitório da PCR e a preparação da amostra é um ponto fundamental para a sensibilidade do método. O aumento da sensibilidade das detecções de microrganismos em alimentos por PCR tem sido observado quando as etapas de preparo da amostra são modificadas para assegurar uma separação efetiva das células bacterianas dos constituintes do alimento. FURRER et al. (1991) obtiveram uma alta sensibilidade da PCR na detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras de leite inoculadas, quando foi possível verificar a presença de 1,0 UFC/mL. Esses autores comentaram sobre a adequação da metodologia de preparo da amostra e da necessidade de cuidados para a remoção de íons  $\text{Ca}^{++}$  e outros componentes inibidores da DNA polimerase. Utilizando-se de técnica imunomagnética para o preparo da amostra, GRAND et al. (2000) reduziram o limite mínimo de detecção de *Mycobacterium avium* em leite de  $2 \times 10^3$  para  $2 \times 10^1$  UFC/mL. MALORNY et al. (2002) concluíram que a aplicação direta da PCR para análise de alimentos requer métodos efetivos de preparo da amostra e devem apresentar o menor número de etapas, uma capacidade de remoção completa dos inibidores da PCR e um alto potencial para conversão para formatos automatizados.

Portanto, evidencia-se a necessidade de avaliar alternativas para promover o aumento da sensibilidade da detecção do gene *apr* em amostras do leite, com ou sem as etapas de extração de DNA total das células bacterianas.

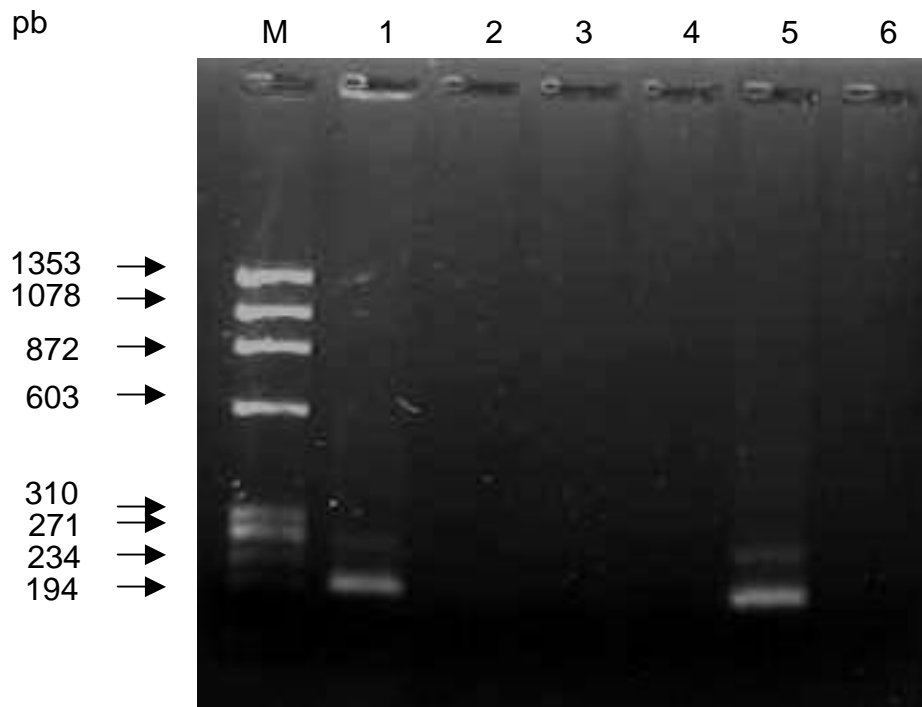


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR da preparação de DNA de diferentes inóculos de *Pseudomonas fluorescens* no leite pasteurizado. Os números correspondem a 1 -  $1,7 \times 10^8$  UFC/mL, 2 -  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL, 3 -  $1,3 \times 10^6$  UFC/mL, 4 -  $1,3 \times 10^5$  UFC/mL, 5 - *Pseudomonas fluorescens* e 6 - controle negativo, respectivamente. "M" corresponde ao DNA do fago X 174, clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A diversidade genética de 31 isolados de bactérias Gram-positivas e 80 Gram-negativas provenientes do leite cru resfriado granelizado foi avaliada por RAPD e foi possível evidenciar uma grande diversidade entre os isolados. Essa diversidade pode estar relacionada com as várias fontes de contaminação do produto analisado, proveniente de propriedades produtoras diversas.

Os três oligonucleotídeos utilizados nas reações de RAPD geraram 88 fragmentos de DNA polimórficos com tamanhos variando de 194 a 3.530 pares de base e uma média de 29 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo para os isolados Gram-negativos. Entretanto, para os isolados Gram-positivos, foram obtidos 66 fragmentos polimórficos de DNA com uma média de 22 fragmentos por oligonucleotídeo, com tamanhos variando de 234 a 3.530 pb.

As semelhanças entre os 40 isolados Gram-negativos não fermentadores e entre *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* situaram-se entre 1 e 88%, entre os 40 isolados Gram-negativos fermentadores entre 2 e 89%, entre os 25 isolados Gram-positivos catalase positiva situaram-se entre 4 e 100% e entre os seis isolados Gram-positivos catalase negativa, entre 10 e 67%. Os isolados Gram-negativos que apresentaram maiores valores de semelhanças foram provenientes de uma mesma amostra de leite cru refrigerado granelizado.

O produto de amplificação do gene *apr* foi observado nas preparações contendo de 5 a 50 ng de DNA/ $\mu$ L de *P. fluorescens*. Não ocorreu a amplificação do gene *apr* quando se analisou o DNA de *E. coli*, *E. cloacae*, *A. hydrophila*, *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, sugerindo uma especificidade da reação. Quando o DNA extraído de *P. fluorescens*, portador do gene *apr*, foi adicionado à mistura contendo preparações de DNA dos cinco organismos que

comprovadamente não apresentaram a amplificação do gene *apr* nas condições de PCR adotadas, verificou-se que a amplificação ocorreu.

A avaliação das 26 culturas de referência usadas indicou a presença do gene *apr* apenas em *P. fluorescens*, *P. aeuginosa* e *Serratia marcescens*.

Os seis grupos que continham os isolados psicrotróficos proteolíticos, Gram-negativos, não fermentadores, fluorescentes, catalase e oxidase positivos apresentaram o fragmento de DNA do gene *apr*. Nesses grupos estavam os isolados que apresentam as características fenotípicas de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Nos demais grupos, constituídos por psicrotróficos proteolíticos, Gram-negativos fermentadores, catalase positivo e oxidase negativo e por Gram-positivos, a presença do fragmento do gene *apr* não foi detectada.

A análise individual dos isolados componentes do grupo três, positivo para a presença do gene *apr*, evidenciou que seis, dos 10 isolados, possuíam o fragmento de DNA de 194 pb específico para a metaloprotease alcalina e a análise do DNA dos isolados do grupo nove, negativo para a presença do gene *apr*, resultou em ausência do fragmento de DNA do gene *apr*.

A técnica de PCR permitiu identificar a presença de uma população acima de  $10^5$  UFC/mL de *P. fluorescens* inoculada em leite desnatado reconstituído após a obtenção do DNA total das bactérias. Entretanto, quando amostras de leite pasteurizado inoculado com populações variando de  $10^5$  a  $10^8$  UFC/mL foram analisadas por PCR, sem a etapa de extração do DNA total, o limite de detecção foi de  $10^8$  UFC/mL.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.6, p.828-835, 1975
- BACH, J.H.; HARTMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, C.J. 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.
- BIRKELAND, S.E.; STEPANIAK, L.; SØRHAUG, T. Quantitative studies of heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* P1 by enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.382-387, 1985.
- BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. **Journal of Food Protection**, v.52, p.805-807, 1989.
- BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.119-130, 1999.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, setembro de 2002.

- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAN, B.J. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.42, p.189-200, 1993.
- COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, p.172-207, 1982.
- CRUZ, C.D. Programa GENES – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.
- 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.
- DUYVESTYEN, W.S.; SHIMONI, E.; LABUZA, T.P. Determination of the end of shelf-life for milk using weibull hazard method. **Lebensm-Wiss Technology**, v.34, p.143-148, 2001.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Journal Dairy**, v.10, p.325-331, 2000a.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.99-106, 2000b.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores genético, RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA: CENARGEN, 1995, p.220.
- FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: RICHARDSON, G.H. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. cap.8, p.189-201, 1992.

- FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.372-379, 1991.
- GARDEA, A.A.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; HIGUERA-CIAPARA, I.; FIGUEROA, C.; MOLINA-CORRAL, J.; RASCÓN, A.; OROZCO A.; INDA, A. Calorimetric assessment of microbial growth in milk as affected by different conditions. **Thermochimica Acta**, v.394, p.179-184, 2002.
- GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems, **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.19-34, 2001.
- GRANT, I.R.; POPEA, C.M.; O'RIORDANA, L.M.; BALLB, H.J.; ROWEA, M.T. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. **Veterinary Microbiology**, v.77, p.369-378, 2000.
- IDF- INTERNATIONAL IDF STANDARD. Estimation of numbers of psychrotrophic microorganisms. 132A: 1991.
- KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LADISCH, M.R. Production of proteases by psychrotrophic microorganism. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3275-3283I, 1991.
- MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, 2002 (In Press).
- MARMUR, J. A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.208, 1961.

- MARTIN, J. H. Symposium: resistant microorganisms in dairy food system. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.149-156, 1981.
- MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto, Editora Holos, 1 ed. cap.15, p.153-161, 2001.
- MATTA, H.; PUNJI, V.; KANWAR, S.S. An immuno-dot blot assay for detection of termo-stable protease from *Pseudomonas* sp. AFT-36 of dairy origin. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.300-302, 1997.
- NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of the National Academy Sciences of the USA**, v.76, p.5269-5273, 1979.
- OEHLRICH, H.K.; MCKELLAR, R.C. Evaluation of an 18°C/45-Hour plate count technique for the enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v.46, p.528-529, 1983.
- OLSEN, J.E.; AABO, S.; HILL, W.; NOTERMANS, S.; WERNARS, K.; GRANUM, P.E.; POPOVIC, T.; RASMUSSEN, H.N.; OLSVIK, O. Probes and polymerase chain reaction for detection of foodborne bacteria pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.1-78, 1995.
- RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.P.; CHANDRASHEKAR, A.; VARADARAJ. M.C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v.16, p.307-314, 2002.
- RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v.8, p.7-9, 1999.

- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-40, 1997.
- URAZ, G. ÇITAK, S. The isolation of *Pseudomonas* and other Gram negative psychrotrophic bacteria in raw milks. **Journal Basic Microbiology**, v.38, p.129-134, 1998,
- WHITE, C.H. Rapid methods for estimation and prediction of shelf-life of milk and dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3126-3132, 1993.
- WIDMER, F.; SEIDLER, J.R.; GILLEVET, M.P.; WATRUD, S.L.; Di GIOVANNI, D.G. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2545-2553, 1998.
- WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S.S.; RALYEA, R.; BOOR, J.K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas spp.* isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2085-2095, 2000.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.