



Diversidade genética de isolados bacterianos de *Pseudomonas* e géneros afins relacionados com defeitos de cor em queijo

Adriana Radamanto Ferreira

Orientador

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Junho, 2017

Composição do júri

Presidente do júri

Doutor, Manuel Vicente de Freitas Martins

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Vogais

Doutor, João Pedro Martins da Luz

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Doutora, Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professora Adjunta da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Agradecimentos

Em mais um término no meu percurso académico, não poderia perder a oportunidade de agradecer a todos que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho para finalizar o Mestrado. Assim deixo o meu agradecimento às várias pessoas e instituições envolvidas, em particular:

À Professora Doutora Cristina Pintado da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, minha orientadora, pela oportunidade que me deu de poder realizar este estágio. Por todo o apoio e confiança transmitidos durante o período de estágio e na elaboração deste trabalho, pela disponibilidade e transmissão dos conhecimentos científicos.

Ao Professor Doutor Rogério Tenreiro da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, por aceitar a minha presença no laboratório Tec Labs sem levantar qualquer tipo de oposição, para que fosse possível a realização da caracterização molecular das culturas.

À Professora Doutora Lélia Chambel da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade total para a transmissão de conhecimentos científicos, técnicos e práticos para a realização da caracterização molecular das culturas. Pela paciência e prontidão para me ajudar a resolver os obstáculos e dificuldades. Por todo o acompanhamento que me deu no período do estágio em que estive no laboratório Tec Labs.

À Engenheira Manuela Goulão do Laboratório de Microbiologia da ESACB, pelo conhecimento transmitido, pela ajuda e carinho ao longo do período de estágio.

A todos os professores, colegas e funcionários desta instituição que mais uma vez me acolheu, a Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

A todos no laboratório Tec Labs que me acolheram, me transmitiram conhecimentos e me ajudaram a resolver os problemas e contratemplos.

À D. Teresa e D. Maria José pelo acolhimento, carinho e amizade demonstrados.

A todos os meus familiares que me deram apoio, lembrando em especial o meu tio António.

Aos amigos pela amizade e paciência, por todo o apoio e carinho. A todos os que acreditaram quando eu deixei de acreditar e me deram força para continuar e ganhar foco.

Em especial e de uma importância maior, aos meus pais e irmão, pela sua paciência, compreensão, ajuda, carinho, princípios, conselhos e apoio incondicional transmitidos nesta que foi uma fase complicada e com muitos contratemplos.

O meu muito obrigado..

Resumo

O escurecimento da casca do queijo é um problema que tem afetado alguns produtores de queijo em Portugal, e em particular na região da Beira Baixa, levando a uma quebra nas vendas e, conseqüentemente, a elevados prejuízos económicos. Em estudos efetuados em França, onde os defeitos de cor na superfície dos queijos têm sido estudados, o género *Pseudomonas* foi identificado como um importante agente deste tipo de alteração. Em Portugal não são conhecidos estudos similares. Assim, este trabalho teve como principal objetivo o isolamento, num meio de cultura seletivo para *Pseudomonas* spp., e posterior caracterização de isolados bacterianos provenientes de uma queijaria da zona do Fundão e respetivos fornecedores de leite, com o intuito de identificar as bactérias que estão associadas ao escurecimento e verificar possíveis vias de contaminação a elas associadas, considerando toda a cadeia de produção do queijo. Foram caracterizados um total de 252 isolados com origem em amostras de leite cru (ovelha, cabra e vaca) usado na produção de queijo, água usada nas explorações produtoras de leite para a higienização do material de ordenha, queijos com defeitos de cor, zaragatoas de superfícies e manipuladores da queijaria e cinta de pano. Após a realização das provas de confirmação (oxidase negativa e ausência de fermentação da glucose), todos os isolados foram inoculados em meio de cultura King B (fluorescência) e em Agar Queijo com e sem tirosina (escurecimento). Em alguns casos realizou-se ainda o teste de suscetibilidade a antibióticos, a prova de hemólise e a identificação por meio da inoculação de galerias API 20NE. Por último foi realizada a todos os isolados a caracterização molecular usando a técnica *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) com os *primers* csm13 e PH. Os perfis foram depois analisados no programa BioNumerics e foram obtidos dendrogramas com base no coeficiente de correlação de Pearson para avaliação das relações de similaridade.

O género predominantemente identificado foi *Pseudomonas*, com 64,8% sobre o total de identificações, e *P. fluorescens* foi a espécie predominante (39,1%), seguida de *P. putida* (23,3%) e *P. aeruginosa* (2,7%). A maioria dos isolados foi sensível aos antibióticos ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipinem, piperacilina + tazobactam. Verificou-se resistência à ampicilina (60,6%) e à penicilina G (60%).

A análise RAPD revelou uma grande diversidade de perfis. Os isolados com identificação *Pseudomonas* spp. encontram-se associados a todas as origens (água, leite cru, queijo, superfícies), não ocorrendo a formação de *clusters* constituídos por isolados de uma só origem. A grande quantidade de *clusters* demonstra uma grande diversidade de perfis entre as espécies. Os isolados com capacidade de provocar escurecimento nos queijos, pertencentes ao género *Pseudomonas* e a outros géneros afins, também se encontram disseminados por todas as origens e distribuídos ao longo de todos os *clusters* formados no dendrograma *composite*. Apesar da complexidade do tema e da grande diversidade de perfis obtidos, os dados obtidos neste trabalho parecem mostrar que os isolados provenientes da casca de queijos com defeitos de cor estão particularmente associados a isolados do ambiente da queijaria, onde estes podem persistir devido à sua capacidade para formar biofilmes.

Palavras chave

Pseudomonas spp., queijo feito com leite cru, escurecimento da casca, RAPD

Abstract

The browning of the cheese bark is a problem that has affected some cheese producers in Portugal, and particularly in the Beira Baixa region, leading to a fall in sales and, consequently, high economic losses. In studies carried out in France, where color defects on the cheeses surface have been studied, the genus *Pseudomonas* has been identified as an important agent of this type of alteration. Similar studies aren't known in Portugal. The main objective of this work was the isolation, in a culture medium selective for *Pseudomonas* spp., and subsequent characterization of bacterial isolates from a cheese-making industry in the Fundão area and respective milk suppliers, in order to identify the bacteria that are associated to the browning and to verify possible routes of contamination to them associated, considering all the chain of production of the cheese. A total of 252 isolates originated from samples of raw milk (sheep, goat and cow) used in the production of cheese, water used in milk farms for the hygiene of milking material, cheeses with color defects, surfaces and manipulators of the cheese shop and cloth tape. After the confirmatory tests (oxidase negative and absence of glucose fermentation), all the isolates were inoculated in King B culture medium (fluorescence) and Cheese agar with and without tyrosine (browning). In some cases the antibiotic susceptibility test, the hemolysis test and the identification through the inoculation of API 20NE galleries were also carried out. Finally, the molecular characterization using the Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was carried out with primers csM13 and PH. The profiles were then analyzed in the BioNumerics program and dendrograms were obtained based on the Pearson correlation coefficient for the evaluation of the similarity relations.

The predominant genus was *Pseudomonas*, with 64,8% of total identifications, and *P. fluorescens* was the predominant species (39,1%), followed by *P. putida* (23,3%) and *P. aeruginosa* (2,7%). Most of the isolates were sensitive to the antibiotics ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, imipinem, pirperacillin + tazobactam. Resistance to ampicillin (60,6%) and penicillin G (60%) were found.

The RAPD analysis revealed a great diversity of profiles. The isolates with *Pseudomonas* spp. identification are associated to all origins (water, raw milk, cheese, surfaces), and the formation of clusters consisting of isolates from a single origin does not occur. The large number of clusters shows a great diversity of profiles between species. The isolates with the ability to cause browning in the cheese belonging to the genus *Pseudomonas* and other related genus are also disseminated by all origins and distributed throughout all the clusters formed in the composite dendrogram. In spite of the complexity of the subject and the great diversity of profiles obtained, the data obtained in this work seem to show that the isolates coming from the bark of cheeses with color defects are particularly associated with isolates from the environment of the cheese-making industry, where these may persist due to their capacity to form biofilms.

Keywords

Pseudomonas spp., cheese made with raw milk, browning of bark, RAPD

Índice geral

Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de figuras	XIII
Índice de tabelas	XV
Lista de abreviaturas, siglas, acrónimos e símbolos	XVII
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Produção de queijos em Portugal.....	3
2.3. HACCP e boas práticas de fabrico e de higiene numa queijaria.....	7
2.4. Microbiota presente no leite.....	9
2.4.1. Formação de pigmento e escurecimento no queijo	11
2.4.2. Formação de biofilmes.....	12
2.5. Problemas associados aos microrganismos psicrotróficos do leite.....	13
2.6. Agentes antimicrobianos – Antibióticos	14
2.7. Caracterização molecular.....	15
2.7.1. Reação em cadeia da polimerase - PCR	15
2.7.2. Biologia molecular na Indústria de produtos lácteos.....	18
2.7.3. Biologia molecular e o género <i>Pseudomonas</i>	18
3. Material e métodos	20
3.1. Proveniência e característica dos isolados bacterianos.....	20
3.2. Preparação das amostras, contagem e isolamento de <i>Pseudomonas</i> spp.	24
3.3. Provas culturais, bioquímicas e antibiograma.....	25
3.3.1. Fluorescência no meio King B.....	25
3.3.2. Escurecimento no meio Agar Queijo.....	26
3.3.3. Suscetibilidade a antibióticos.....	26
3.3.4. Identificação com base no API 20NE.....	29
3.4. Caracterização molecular.....	30
3.4.1. Extração de DNA.....	30

3.4.2. Reação PCR e eletroforese	31
3.5. Crioconservação a -80°C.....	32
4. Resultados e Discussão	33
4.1. Identificação com base no API 20NE.....	33
4.2. Suscetibilidade a antibióticos	36
4.3. Caracterização molecular	40
4.3.1. <i>Fingerprinting</i> dos isolados	40
4.3.2. Avaliação de relação entre as amostras por análise de um dendrograma <i>composite</i> 40	
4.4. Capacidade de escurecimento e fluorescência de bactérias do género <i>Pseudomonas</i>	47
4.5. <i>Pseudomonas</i> spp. - da matéria prima ao produto final.....	51
5. Conclusão	54
6. Referências Bibliográficas.....	56
Anexos.....	62
Anexo I - Caracterização morfológica das colónias	63
Anexo II - Identificação dos isolados.....	64
Anexo III – Dendrogramas: Parte 1.....	67
Anexo IV – Escurecimento dos isolados em Agar Queijo.....	71
Anexo V – Dendrogramas: Parte 2.....	76

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema geral das etapas do processo de fabrico de queijo.....	4
Figura 2 – Prova da fermentação da glucose positiva (à esquerda) e negativa (à direita).....	25
Figura 3 - Aparelho de luz ultravioleta, SVL 220V, 50Hz.	25
Figura 4 - Dispensador de discos da marca OXOID.	27
Figura 5 - Medição dos halos em redor dos discos com a craveira digital, após a incubação das placas.	27
Figura 6 – API 20NE referente ao isolado 137 às 48 horas.	35
Figura 7 – Placa meio de cultura King B demonstrando o escurecimento de Z3-10 ⁻² - 3e.....	36
Figura 8 – Placa meio de cultura Mueller Hinton demonstrando o escurecimento de Z3-10 ⁻² -3e.	36
Figura 9 - Placa meio de cultura King B demonstrando o escurecimento de colónias tipo e.	36
Figura 10 - Placa meio de cultura Mueller Hinton demonstrando o escurecimento de colónias tipo e.....	36
Figura 11 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 9, diluição 10 ⁻² , colónia 1l', exemplo de margem inteira (1), inibição completa (3), halo duplo (5) e resistência total (8).....	39
Figura 12 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 8, diluição 10 ⁻² , colónia 1d, exemplo de inibição parcial (4) e crescimento acentuado em redor do halo de inibição (7).	39
Figura 13 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 7, diluição 10 ⁻² , colónia 1k, exemplo de margem difusa (2) e contaminantes na zona do halo de inibição (6).	39
Figura 14 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 5, diluição 10 ⁻² , colónia 3, exemplo de convergência de halos entre antibióticos (9).	39
Figura 15 - Exemplo de perfis numerados obtidos com a recção PCR e eletroforese com o <i>primer</i> csM13 e marcadores 1 kb Plus (M) de 100 pb a 12000 pb.	40
Figura 16 - Dendrograma de similaridade calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson com base nos perfis dos <i>primers</i> csM13 e PH.	46
Figura 17 - Exemplos de várias tonalidades do escurecimento provocado por alguns isolados estudados, desde de uma tonalidade amarelo limão a um castanho muito escuro (tonalidade negra). Placas superiores: Agar Queijo com tirosina; Placas inferiores: Agar Queijo sem tirosina.	47
Figura 18 - Gráfico representativo dos resultados do escurecimento em Agar Queijo dos isolados de leite, água, zaragatoas a equipamentos, manipuladores e casca de queijo, leitura realizada às 48 h.	47
Figura 19 - Gráfico representativo dos resultados do escurecimento em Agar Queijo dos isolados das zaragatoas, leite e cinta da recolha do dia 24 de fevereiro de 2016, com leitura realizada às 48 h após a inoculação.	48
Figura 20 - Gráfico representativo dos resultados do escurecimento em Agar Queijo dos isolados das zaragatoas, leite e cinta da recolha do dia 24 de fevereiro de 2016, com leitura realizada 21 dias após a inoculação.	48
Figura 21 - Isolado originário da cinta de pano em meio de cultura King B.....	49

Figura 22 - Isolado originário da cinta de pano em meio de cultura Agar Queijo com tirosina (direita) e Agra Queijo sem tirosina (esquerda).....	49
Figura 23 - Placa com isolados com fluorescência (1º e 4º isolado) e com fluorescência mais fraca (2º isolado) e sem fluorescência (3º e 5º isolado).....	50
Figura 24 - Placa em que todos os isolados apresentam fluorescência.....	50
Figura 25 - Placa de King B onde os isolados apresentam cor amarelo limão em redor e sobre o crescimento.	50
Figura 26 - Dendrograma das réplicas referentes ao <i>primer</i> PH, valores de similaridade para o cálculo da reprodutibilidade.	67
Figura 27 - Dendrograma das réplicas referentes ao <i>primer</i> csM13, valores de similaridade para o cálculo da reprodutibilidade.	68
Figura 28 - Dendrograma de similaridade calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson com base nos perfis do <i>primer</i> csM13.	69
Figura 29 - Dendrograma de similaridade calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson com base nos perfis do <i>primer</i> PH.	70
Figura 30 - Dendrograma de similaridade com isolados que continham capacidade de escurecimento no meio de cultura Agar queijo.....	76
Figura 31 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 2.	77
Figura 32 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 8.	77
Figura 33 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 9.	77
Figura 34 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 17.	77
Figura 35 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 20.	78
Figura 36 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 45.	78
Figura 37 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 83.	78
Figura 38 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 85.	78
Figura 39 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 87.	78
Figura 40 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 103.	79
Figura 41 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 106.	79
Figura 42 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 114.	79
Figura 43 - Dendrograma de similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 119.	79
Figura 44 - Dendrograma de similaridade com isolados identificados do género <i>Pseudomonas</i> spp.	80

Índice de tabelas

Tabela 1 - Características físico-químicas de queijos DOP e IGP portugueses preparados com leite cru de pequenos ruminantes.	6
Tabela 2 - Referências e origem dos isolados das amostras de água.	20
Tabela 3 - Referências dos isolados de amostras de leite cru de ovelha e os respetivos produtores.	21
Tabela 4 - Referências dos isolados de amostras de leite cru de cabra e os respetivos produtores.	22
Tabela 5 - Referências dos isolados de amostras de queijo.	22
Tabela 6 – Características dos isolados provenientes das zaragoas e da cinta.	23
Tabela 7 - Especificação dos antibióticos utilizados no estudo de suscetibilidade.	26
Tabela 8 – Valores padrão (mm) dos diâmetros das zonas de inibição, usados para a classificação das culturas como Suscetíveis (S), Intermédias (I) ou Resistentes (R).	28
Tabela 9 – Valores padrão (mm) dos diâmetros das zonas de inibição para o controlo de qualidade usando a cultura <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	28
Tabela 10 – Identificação de 74 isolados provenientes de zaragoas a superfícies, água, leite, queijo e de uma cinta utilizando o sistema de identificação API 20NE.	34
Tabela 11 - Percentagem dos isolados com classificação Resistente, Intermédio e Sensível para cada antibiótico.	38
Tabela 12 - Caracterização morfológica atribuída a cada tipo de colónia.	63
Tabela 13 - Identificação, perfis numéricos dos isolados provenientes de zaragoas a superfícies, água, leite e queijo com base na utilização do sistema de identificação API 20NE.	64
Tabela 14 - Repicagem em Agar queijo com tirosina e sem tirosina, acompanhamento do escurecimento dos isolados às 48 h, 7 dias e 21 dias.	71

Lista de abreviaturas, siglas, acrónimos e símbolos

µg – Micrograma

µl – Microlitros

AN- Agar nutritivo

AP-PCR - *Arbitrarily primed PCR*

ATCC – *American Type Culture Collection*

C – Controlo

ca. – cerca de

Cat no – Número de catálogo

CIP – *Clean in place*

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

col. – Colónia

DGADR – Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

dil. – Diluição

DOP – Denominação de origem protegida

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

epp – Eppendorf

ESACB – Escola Superior Agrária de Castelo Branco

FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

HACCP - *Hazard analysis and critical control point*

IGP – Indicação geográfica protegida

IU - *Internacional unit*

LB Agar – Luria-Bertani agar

Lot. – Lote

M – Marcador

MSP-PCR - *Micro/Mini satellite-primed PCR*

n e n^o - Número

nm – Nanómetros

pb -Par de bases

PCA – *Plate count agar*

PGA- *Purple glucose agar*

pH- Potencial hidrogeniônico
PPA – *Penicillin and pimaricin agar*
RAPD – *Random amplified polymorphic DNA*
Ref^ª – Referência
RNA - *Ribonucleic acid*
rpm – Rotações por minuto
SDS - *Sodium dodecyl sulfata*
SM – Suspensão mãe
spp. – Espécies de um determinado gênero científico
TE – Tris- EDTA
TIFF - *Tagged image file format*
TMPD- *N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylenediamine*
TSA – *Tryptone soya agar*
TSYEA – *Tryptone soya yeast extract agar*
Z – Zaragatoa

1. Introdução

Este trabalho surgiu para dar continuidade a um trabalho de pesquisa e investigação anteriormente implementado por parte do Laboratório de Microbiologia da ESACB com o objetivo de estudar a problemática do escurecimento dos queijos produzidos na região da Beira Baixa.

A qualidade e a segurança dos alimentos constituem preocupações do consumidor atual, que espera que os alimentos que compra e consome sejam apetecíveis, nutritivos e ao mesmo tempo seguros. Este último aspeto significa que os alimentos prontos a consumir não podem colocar a saúde e bem-estar do consumidor em perigo. Do ponto de vista do produtor, além da preocupação de produzir um alimento seguro, a questão sobre os prejuízos económicos provocados pela contaminação e deterioração do leite cru e derivados, são uma outra preocupação, já que estas podem levar a uma quebra no rendimento e à inadequabilidade do produto para consumo.

Ao longo do processo de produção do queijo não poderão ser negligenciadas regras e procedimentos que contribuem para uma higiene e ausência de contaminações do produto final. A matéria-prima principal do queijo, o leite, é um meio muito suscetível a contaminações por parte do úbere, do ambiente, do equipamento de ordenha e das pessoas que o manipulam. Assim, um rebanho saudável e uma boa higiene ao longo de todo o processo de produção vão contribuir para uma boa qualidade do queijo (Sandrou & Arvanitoyannis, 2000).

Um dos problemas com os quais os produtores de queijo, produzido com leite cru, se têm vindo a confrontar diz respeito ao surgimento de defeitos de cor ao longo da etapa de maturação. O estudo deste problema torna-se importante de modo a delinear medidas para combater o problema indesejado ao longo do processo de produção do queijo, desde a produção primária até ao momento em que o consumidor adquire o produto final.

Segundo o Regulamento (CE) N^o 852/2004 de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios, torna-se importante e necessária uma abordagem integrada para garantir a segurança dos géneros alimentícios, desde do local da produção primária até à colocação no mercado. A aplicação de boas práticas higiénicas e um processo baseado nos princípios HACCP será um bom princípio e a melhor forma de existir um controlo e garantia da segurança dos géneros alimentícios.

Torna-se assim importante perceber o que está na origem dos defeitos de cor em queijos, qual a microbiota que poderá estar associado a essas ocorrências e de que forma estes defeitos podem ser evitados. O estudo centrou-se nos microrganismos do tipo *Pseudomonas*, os quais produzem vários tipos de pigmentos. Este tipo de microrganismo é dos mais importantes na deterioração de produtos lácteos, já que produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas, algumas das quais não se degradam sob o efeito da temperatura de pasteurização e tratamentos de UHT. Desta forma, podem causar deterioração no leite, durante o seu armazenamento (Simões *et al.*, 2010).

Assim, este estudo tem como principal objetivo a caracterização de diferentes isolados bacterianos, maioritariamente pertencentes ao género *Pseudomonas*, provenientes de amostras de leite, queijo, água e ambiente, obtidas numa queijaria da região centro de Portugal e nos diferentes produtores de leite cru a ela associados. Com esta caracterização pretende-se verificar a possível existência de um padrão particular associado aos defeitos de

cor e identificar a possível origem das fontes de contaminação, com o fim último de contribuir para a futura implementação de medidas que conduzam à sua eliminação.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Produção de queijos em Portugal

A história do queijo remonta a tempos antiquíssimos, embora muitos especialistas considerem a Idade Média como o marco inicial do seu fabrico. Os antigos gregos atribuíam a descoberta do queijo a Aristeu, rei da Arcádia, filho de Apolo e Cirene. Uma lenda atribui a um nómade árabe que, em uma de suas jornadas pelo deserto, teria levado como alimento tâmaras secas e um pouco de leite em um cantil feito de estômago seco de carneiro. Depois de um certo tempo, quando foi beber o leite descobriu que ele se tinha transformado num alimento sólido de sabor agradável. Independente de como ele foi descoberto, o queijo tem sido utilizado ao longo do tempo como uma forma de preservação do leite (Perry, 2004).

O leite cru é a principal matéria-prima na produção do queijo tradicional português, sendo definido, no Regulamento (CE) Nº 853/2004 de 29 de Fevereiro, como produto obtido pela secreção da glândula mamária de animais de criação, não aquecido a uma temperatura superior a 40°C nem submetido a um tratamento de efeito equivalente.

Segundo a Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro, considera-se queijo o produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoramento do leite inteiro ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído, e também da nata, do leitelho, bem como da mistura de alguns ou de todos os produtos, incluindo o lactossoro, sem ou com adição de outros géneros alimentícios. A classificação do mesmo baseia-se no tipo de cura (queijo curado, queijo curado pela ação de bolores, queijo fresco), na sua composição (sem e com adição de géneros alimentícios diferentes do queijo), na consistência (em função da percentagem de humidade para cada tipo de queijo) e na matéria gorda (em função da matéria gorda no extrato seco).

Dependendo do tipo de queijo, o seu processo de fabrico tem etapas específicas para que seja obtido o produto final pretendido, mas existem etapas que são fundamentais e em comum nos vários processos (Figura 1).

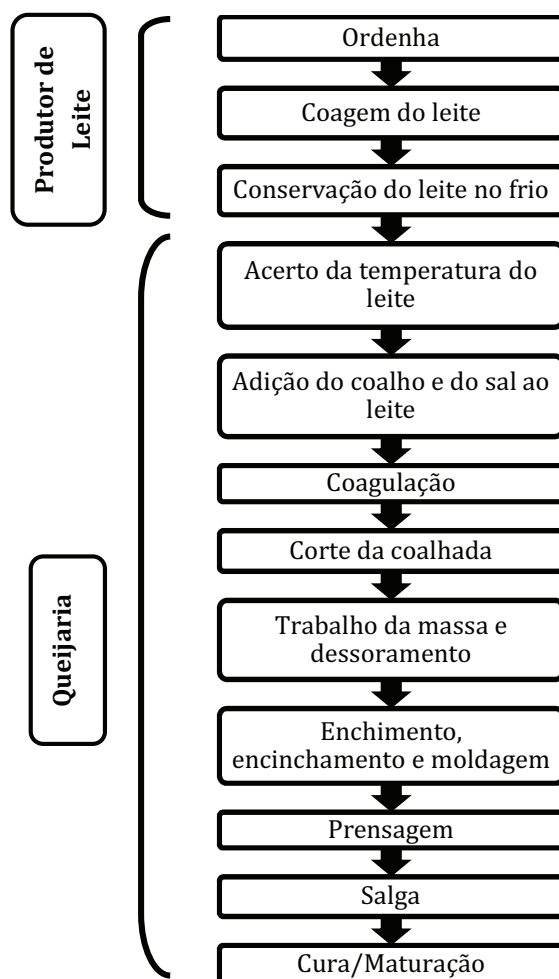


Figura 1 - Esquema geral das etapas do processo de fabrico de queijo.

No processo da ordenha a higiene é um ponto muito importante. O local, o animal (tetos e úbere), manipuladores (ordenhadores), equipamentos e utensílios devem ser adequadamente limpos e higienizados após cada ordenha.

A coagem do leite remove a sujidade e as impurezas, mas também reduz a quantidade de microrganismos presentes no leite sendo uma medida importante na qualidade e segurança do queijo. Neste passo deve ser dada grande importância à higienização do equipamento, principalmente do filtro.

A coagulação é a fase inicial da transformação de leite em queijo. Nesta fase deve-se ter em atenção fatores como a temperatura e o pH do leite e o tempo de coagulação, usando para isso equipamentos adequados e em boas condições para o controlo destas variáveis. A higienização dos equipamentos, e da cuba de coagulação, continua a ser um ponto importante.

A etapa do corte da coalhada tem como objetivo extrair o soro que está no interior da coalhada, através do seu corte, com o mínimo de perdas de proteína e gordura. O tipo e tempo de corte conduz a diferentes tipos de queijo, já que quanto maior a duração e quanto mais pequenos forem os fragmentos da coalhada maior o dessoramento e menor a humidade do queijo resultante. Para realizar este corte é utilizado um equipamento específico, as liras, as quais deverão estar devidamente higienizadas e isentas de qualquer tipo de ferrugem ou outra característica que contamine a coalhada.

De forma a melhorar a consistência, a textura e a forma do queijo é realizada a prensagem, quer seja por pesos ou por ação pneumática. Esta deverá ser feita em local fresco e com material bem higienizado.

A salga evita que o queijo se deteriore. Esta pode ser realizada de várias formas, através da incorporação direta na massa, aplicação direta no queijo, colocação do queijo em salmoura ou por mistura destes dois últimos métodos. Neste passo é importante ter em atenção a higienização das mãos dos manipuladores e a qualidade do sal utilizado, sendo que este deve ser puro (química e bacteriologicamente) e deve estar bem seco.

A maturação é a “fase de cura” do queijo, em que as características finais do queijo se desenvolvem, pela transformação da coalhada prensada. Nesta fase, é demonstrado como as condições aplicadas nas etapas anteriores são importantes, já que influenciam o modo como os agentes de transformação (microrganismos, enzimas) atuam sobre o substrato (lactose, caseína coagulada, matéria gorda) dependendo das condições de ambiente aplicadas (temperatura, humidade relativa) (Matos, 1996; Martins, 2006).

Em Portugal temos vários tipos de queijo feitos com leite cru, alguns dos quais com classificação como DOP e IGP. Na tabela seguinte são apresentadas algumas das características desses queijos. Os dados apresentados na tabela foram baseados nos Decretos Regulamentares referentes a cada região demarcada.

Tabela 1 - Características físico-químicas de queijos DOP e IGP portugueses preparados com leite cru de pequenos ruminantes.

Queijo ou IGP	DOP	Tipo de leite	Pasta	Tempo de cura	Humidade (%)	Legislação
Azeitão		Cru de ovelha	Semimole amanteigada	Mínimo 20 dias	63-69	Decreto Regulamentar nº 49/86 de 20 de Outubro
Castelo Branco		Cru de ovelha	Semidura ou Semimole	Mínimo 40 dias	54-69	Decreto Regulamentar nº 22/88 de 25 de Maio
Évora		Cru de ovelha	Semidura ou dura	Mínimo 30 dias	-	
Nisa		Cru de ovelha	Semidura	Mínimo 45 dias	54-65	Decreto Regulamentar nº 6/93, de 16 de Março
Serpa		Cru de ovelha	Semimole amanteigada	Mínimo 45 dias	61-69	Decreto Regulamentar nº 39/87, de 29 de Junho
Serra da Estrela		Cru de ovelha	Semimole amanteigada	Mínimo 40 dias	61-69	Decreto Regulamentar nº 42/85, de 29 de Julho
Terrincho		Cru de ovelha	Semidura	Mínimo 30 dias	55-63	Despacho nº 16/94
Cabra Transmontano		Cru de cabra	Extra- dura	Mínimo 60 dias	70-85	
Amarelo da Beira Baixa		Cru de ovelha estreme ou mistura de ovelha e cabra	Semidura ou semimole	Mínimo 40 dias	54-69	Decreto Regulamentar nº 22/88 de 25 de Maio
Picante da Beira Baixa		Cru de ovelha ou cabra estreme ou em mistura de ovelha e cabra	Dura ou Semidura	Mínimo 120 dias	49-63	Decreto Regulamentar nº 22/88 de 25 de Maio
Rabaçal		Cru de ovelha e cabra	Semidura ou dura	Mínimo 120 dias	-	
Mestiço de Tolosa		Cru de ovelha e cabra	Semimole	3 a 4 semanas	-	

2.2. Queijos da região demarcada da Beira Baixa

A designação “Queijos da Beira Baixa” atribui-se a um conjunto de queijos obtidos a partir de leite cru de ovelha Merino da Beira Baixa e outras raças bem adaptadas à região ou de leite cru de ovelha e cabra Charnequeira e outras muito bem adaptadas à região, de grande tipicidade e profundamente ligados à região de origem e às práticas de pastorícia aí desenvolvidas, face ao tipo de solos, clima e pastagens (DGADR, 2016).

O “Queijo Amarelo da Beira Baixa” é um queijo curado de forma cilíndrica, de pasta semidura ou semimole, ligeiramente amarelado, de aroma intenso mas agradável e sabor limpo ligeiramente acidulado. Este queijo é obtido pelo esgotamento da coalhada após

coagulação do leite de ovelha por ação do coalho animal e produzido na região demarcada. Este queijo, é produzido com uma percentagem de leite de ovelha entre 50% a 100% e leite de cabra entre 0% a 50%, contém uma percentagem de gordura de 45% a 60% e uma percentagem de humidade entre 54% a 69%. O seu tempo de maturação é de pelo menos 40 dias, a uma temperatura entre os 10°C e os 18°C com uma humidade relativa de 50% a 70%. O seu tempo de maturação pode ser prolongado até aos 90 dias, sendo definido este queijo por “Queijo Amarelo da Beira Baixa Velho” (DGADR, 2016; Decreto Regulamentar 22/88 de 25 de Maio).

O “Queijo Castelo Branco” é um queijo curado de forma cilíndrica, de pasta semidura ou semimole, ligeiramente amarelada, de aroma e sabor acentuados. Este é obtido por esgotamento lento da coalhada, após coagulação do leite cru de ovelha *in extreme* por ação de uma infusão de cardo (*Cynara cardunculus*) e proveniente da região demarcada. Este queijo é produzido com 100% de leite de ovelha, com uma percentagem de gordura entre 45% a 60% e 54% a 69% de humidade. O seu tempo de maturação é no mínimo 40 dias, a uma temperatura entre os 8°C e os 14°C com uma humidade relativa de 80% a 90%. Um cura de pelo menos 90 dias, faz com que o queijo seja denominado de “Queijo de Castelo Branco Velho” (DGADR, 2016; Decreto Regulamentar 22/88 de 25 de Maio).

O “Queijo Picante da Beira Baixa” é um queijo curado, de pasta dura ou semidura, de cor branco sujo a acinzentada, com textura muito fechada e quebradiça, sem crosta, de aroma ativo e característico e sabor forte e acentuadamente picante. Este queijo é obtido pelo esgotamento da coalhada após coagulação do leite de ovelha ou cabra cru, *in extreme* ou de mistura dos dois, por ação do coalho animal e produzido na região demarcada. Este queijo é produzido com percentagem de leite de ovelha e cabra entre os 0% aos 100%, contendo uma percentagem de gordura de 35% a 60% e humidade de 49% a 63%. O seu tempo de maturação é no mínimo 120 dias a uma temperatura entre os 10°C e os 18°C com uma humidade relativa de 70% a 80% (DGADR, 2016; Decreto Regulamentar 22/88 de 25 de Maio).

2.3. HACCP e boas práticas de fabrico e de higiene numa queijaria

Durante o processo de fabrico de alimentos, as normas de higiene devem ser tidas em conta para que a contaminação do alimento, tanto por causas externas como internas ao alimento, seja reduzida ao mínimo. Estas normas devem ser estabelecidas num plano de higienização adequado e adaptado ao tipo de indústria ao qual está a ser aplicado, o que leva a ter em conta alguns fatores: tipo de alimento e microbiota a ele associado, o grau de higiene na indústria, em particular nas superfícies, o tipo de materiais usados, o tipo de detergente e desinfetante (modo de ação e concentração) e a frequência de higienização. A ação e efeito da higienização devem ser monitorizados e avaliados, por exemplo por análises microbiológicas, para verificar se estas são eficazes.

Na indústria do leite e produtos lácteos, a preocupação por uma higiene adequada deve estar presente desde a produção primária, ou seja logo no estábulo, existindo certos cuidados a ter para que o leite obtido não contenha contaminações indesejadas, já que este é fonte de proteínas, lipídios, hidratos de carbono, minerais e vitaminas que o tornam num alimento vulnerável a alterações físico-químicas e deterioração por microrganismos. Uma alimentação

adequada do animal, um animal saudável e com acompanhamento adequado por veterinários, uma boa higienização na ordenha, bem como uma conservação/armazenamento adequado do leite até ao seu processamento são alguns dos aspetos chave na produção de um queijo de boa qualidade (Matos, 1996).

A segurança alimentar está relacionada com a presença de perigos associados aos géneros alimentícios quando ocorre a sua ingestão pelo consumidor. Como a introdução desses perigos pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia alimentar, torna-se essencial a existência de um controlo e uma comunicação ao longo da cadeia alimentar para assegurar que todos os perigos relevantes são identificados. Para realizar esse controlo foi criado o sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP), uma Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (ISO 22000, 2005).

O HACCP é um sistema de identificação e monitorização de perigos alimentares específicos, tendo como finalidade o estabelecimento de Pontos Críticos de Controlo (PCC), os seus parâmetros e seus limites críticos. Os perigos alimentares são repartidos por três grupos: (1) Biológicos, incluindo os microbiológicos (bactérias, fungos, vírus e parasitas); (2) Químicos (toxinas bacterianas, micotoxinas, produtos químicos e industriais); (3) Físicos (areias, vidro, madeira, ossos, objetos pessoais, fragmentos metálicos e plásticos). O sistema HACCP consiste em sete princípios para estabelecer, implementar, manter e reformular o plano, que em conjunto com boas práticas de higiene, deve reforçar a responsabilidade das tarefas na indústria alimentar (Regulamento (CE) nº 852, 2004).

A Portaria nº 533/93 de 21 de Maio, (1993), apresenta normas sanitárias aplicáveis à produção e à colocação no mercado de leite cru, de leite tratado termicamente e de produtos à base de leite. Nesta são apresentados critérios, condições de higiene a considerar desde a estabulação ao produto acabado.

Uma queijaria deve dispor de locais para os seus colaboradores realizarem a mudança de vestuário e de instalações sanitárias. Para a receção do leite e expedição do produto acabado deverá existir locais que permitam a proteção das operações aí efetuadas, mantendo-se uma barreira higiénica entre o exterior e o interior das instalações. Estas têm de estar localizadas para que o leite que está a entrar na queijaria em momento algum contacte com o produto acabado, aplicando um circuito do leite ordenado, de marcha em frente. A zona de produção deve ser adequada às operações de fabrico, nas instalações, também deve existir uma sala de cura com dimensões adequadas à capacidade de produção, um local de lavagem do queijo e um local para lavagem, desinfeção e resguardo do material e utensílios de fabrico (Despacho nº 49/96, 1996).

Os equipamentos e utensílios utilizados no fabrico do queijo constituem um aspeto importante para o aumento da qualidade do produto. Estes devem ser constituídos em material não corrosivo, não poroso, imputrescível, não tóxico, resistente às lavagens e desinfeções e preferencialmente em aço inoxidável (Portaria nº 533/93, 1993). As instalações, equipamentos e utensílios devem ser mantidos em bom estado de higiene e conservação, sendo feita uma correta limpeza de forma a eliminar os detritos e desinfeção para eliminar microrganismos prejudiciais. A frequência destes procedimentos deve ser definida num plano de limpeza e desinfeção, e deverá ser efetuada no fim de cada fase de trabalho e pelo menos uma vez por dia (Despacho nº 49/96, 1996).

A sensibilização dos colaboradores para aspetos relacionados com a higiene e segurança alimentar, para a sua higiene (pessoal, vestuário, mãos) e saúde devem ser transmitidos através da formação. Estes devem usar vestuário e calçado adequado e limpo e manter o cabelo protegido, devem lavar as mãos sempre que recomece o trabalho e quando necessário e quando constituírem risco de contaminação devem ser afastados da manipulação dos produtos (Despacho nº49/96, 1996).

Na aplicação de boas práticas no processo produtivo, todas as fases devem ser consideradas: (1) Escolha de fornecedores de leite; (2) Recolha e transporte do leite; (3) Receção e armazenamento de leite; (4) Laboração; (5) Cura do queijo; (6) Lavagem do queijo; (7) Conservação; (8) Rotulagem; (9) Acondicionamento e embalagem; (10) Distribuição; (11) Rastreabilidade; (12) Tratamento das águas residuais.

2.4. Microbiota presente no leite

Na produção do queijo pode ser escolhido o leite cru ou o leite pasteurizado como matéria-prima base (Lafarge *et al.*, 2004).

Em termos organoléticos, os queijos produzidos com leite cru possuem um intenso e forte sabor, por comparação com os queijos feitos com leite pasteurizado. De acordo com várias fontes citadas por Masoud *et al.* (2012), as características referidas atrás devem-se à presença no queijo feito com leite cru de vários microrganismos: *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Arthrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Acinetobacter* spp.. Além disso, queijos produzidos com leite cru possuem compostos voláteis, como ácidos carboxílicos, ésteres e alcoóis que resultam da fermentação dos constituintes do leite pelos microrganismos naturalmente presentes neste. Para além disso, os queijos feitos com leite cru possuem proteases e lipases que, não sendo inativadas por um tratamento térmico, contribuem para as características organoléticas do queijo feito com leite cru (Yoon *et al.*, 2016). Ainda em relação à composição volátil do leite cru, esta é, de acordo com Hettinga *et al.* (2008), determinada pela dieta do animal, pela contaminação microbiana e química e pela degradação enzimática.

Como o leite é uma fonte rica em nutrientes, constitui um meio adequado à multiplicação de microrganismos patogénicos e de deterioração, estando na origem de alterações organoléticas e físico-químicas, que poderão ter implicações na qualidade e segurança dos produtos lácteos obtidos daquele.

Relativamente aos microrganismos dominantes no leite cru, estes geralmente incluem espécies de bactérias lácticas (particularmente dos géneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*), *Pseudomonas* spp., *Micrococcaceae* (*Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.) e leveduras. Outros grupos microbianos presentes nos leites crus incluem os géneros *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Listeria* e a família *Enterobacteriaceae* (Lafarge *et al.*, 2004). No leite e nos produtos lácteos, as bactérias psicotróficas são muito diversas, desde espécies Gram-positivas (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus*) e espécies Gram-negativas (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*) (Leriche &

Fayolle, 2012; Lafarge *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2012).

As bactérias mais comuns de provocar problemas na indústria dos produtos lácteos são os *Streptococcus agalactiae* e outras espécies de *Streptococcus*, bactérias coliformes, *Pseudomonas* spp. e *Corynebacterium pyogenes*. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter jejuni* são agentes patogénicos presentes no leite cru e produtos lácteos que causam uma maior preocupação (Bore & Langsrud, 2005).

A microbiota do leite cru e, conseqüentemente, a composição dos queijos produzidos com leite cru varia de acordo com a estação, origem geográfica e manejo durante a produção (Ercolini *et al.*, 2009).

A contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicotróficas pode ter origem no fornecimento de água de qualidade inadequada, deficientes procedimentos de higienização, animais doentes (mastite – inflamação da glândula mamária), deficiente armazenamento de leite e falhas no processamento do mesmo. Portanto, procedimentos de higienização no processo de produção constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de qualidade, o que favorece a uma boa qualidade do produto final (Pinto *et al.*, 2006).

No caso da indústria dos produtos lácteos o controlo do leite influencia o produto final. A sua refrigeração e/ou o seu tratamento térmico antes do seu processamento pode levar ao aparecimento ou não de microrganismos indesejáveis, o que originar características únicas aos queijos.

O leite não pasteurizado é frequentemente armazenado a temperaturas de refrigeração até à sua utilização no processo de fabrico dos queijos. O armazenamento do leite cru a baixas temperaturas inibe o crescimento de bactérias mesófilas e, conseqüentemente reduz a deterioração originada pelas mesmas (Yoon *et al.*, 2016). No entanto, esta prática favorece o crescimento de bactérias psicotróficas que podem produzir enzimas extracelulares resistentes ao calor (termoestáveis), como proteases e lipases (Marchand *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2016). As temperaturas ótimas para as enzimas termoestáveis de *Pseudomonas* e outras bactérias Gram-negativas têm sido descritas entre 30°C e 45°C e uma atividade reduzida (por exemplo 30%) abaixo de 7°C para as enzimas de algumas estirpes desses géneros. Os valores de pH ótimos descritos variaram entre 6,0 e 9,0 (Murphy *et al.*, 2016).

As bactérias psicotróficas, que incluem estirpes pertencentes a *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., e *Enterobacteriaceae* são capazes de proliferar a temperaturas de refrigeração. Mesmo que estas bactérias psicotróficas sejam removidas do leite cru, as enzimas por elas produzidas podem permanecer e causar deterioração do queijo no período de produção e de maturação (Yoon *et al.*, 2016). O tratamento térmico necessário para eliminar as enzimas proteolíticas presentes no leite cru é considerado um tratamento prejudicial ao leite (Marchad *et al.*, 2008). As bactérias psicotróficas sintetizam metaloproteases, cuja secreção ocorre na fase de crescimento exponencial ou estacionária tardia (Marchad *et al.*, 2008).

Um crescimento dominante de bactérias psicotróficas durante o período de refrigeração altera o equilíbrio microbiano do leite cru, já que estas podem competir com bactérias benéficas na produção do queijo. Assim, a inibição inicial das bactérias psicotróficas será um

pré-requisito na produção de um queijo com características organolépticas e microbianas satisfatórias (Yoon *et al.*, 2016).

A degradação dos componentes do leite pela atividade enzimática pode reduzir o tempo de prateleira do leite processado. Por exemplo, a digestão da caseína por proteases pode conferir um sabor amargo e levar à coagulação e gelificação do leite. As lipases hidrolisam a tributirina e a gordura do leite para produzir ácidos gordos livres, o que faz com que o leite tenha sabor a ranço, amargo, sujo e a sabão. A lecitinase degrada a membrana dos glóbulos de gordura do leite e aumenta a suscetibilidade da gordura do leite à ação das lipases. Os produtos hidrolíticos das gorduras e proteínas do leite irão diminuir a qualidade das características organolépticas dos produtos lácteos (Dogan & Boor, 2003).

A pasteurização do leite é considerada uma das medidas mais eficazes para controlar a contaminação microbiana e assim melhorar a higiene do leite. Contudo, as bactérias formadoras de esporos (tais como *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp.) e os microrganismos resistentes ao calor podem suportar a pasteurização e sobreviver. O tratamento térmico provoca uma redução do número de microrganismos antagonistas que contribuem para a inativação de bactérias patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Yoon *et al.*, 2016).

2.4.1. Formação de pigmento e escurecimento no queijo

Segundo Kanner & Rosenthal (1992), a oxidação de lípidos ocorre em alimentos que contenham muita gordura (entre eles o leite). Este processo pode afetar praticamente todos os atributos de qualidade dos alimentos, como o aroma, cor, sabor e textura. No caso da cor, verifica-se que muitas vezes o escurecimento dos alimentos resulta de reações de condensação entre produtos de oxidação e proteínas (Kanner & Rosenthal, 1992).

O leite pode sofrer variadas alterações no odor, sabor, cor e textura. Estas alterações determinam a qualidade do produto final caso o leite seja processado. No caso da cor do leite, esta está diretamente relacionada com as características físicas e a composição químicas do leite. Quando há alterações na cor dos produtos lácteos, estas podem ser provocadas por outras reações químicas ocorridas anteriormente ao processo ou podem ser o resultado do crescimento de microrganismos produtores de pigmentos.

O género *Pseudomonas* produz uma variedade de pigmentos fluorescentes (pioverdina e derivados de pteridinas) e não fluorescentes (piocianina, clororafina e pigmentos insolúveis – “carotenóides”). O pigmento piocianina (pigmento azul esverdeado hidrossolúvel) pode ser produzido por *Pseudomonas aeruginosa* e por *Pseudomonas fluorescens*, sendo no entanto a produção deste pigmento uma característica mais significativa da *Pseudomonas aeruginosa* (El-Fouly *et al.*, 2015). Ao juntar os pigmentos piocianina e pioverdina é originado um pigmento de cor verde brilhante, o qual é característico de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria, para além de todos os pigmentos referidos, também pode produzir outros pigmentos hidrossolúveis, a piorrubina (pigmento vermelho) e a piomelanina (pigmento castanho a negro).

Nos produtos lácteos, também se destacam as espécies *Pseudomonas synxantha* (que confere uma cor amarelada ao leite), *Pseudomonas syncyanea* (que no leite refrigerado pode provocar uma pigmentação azul) e *Serratia marcescens* (que cria áreas vermelhas no queijo) (Cenci-Goga *et al.*, 2014).

2.4.2. Formação de biofilmes

Apesar de terem passado muitos anos após a primeira referência sobre biofilmes, estes continuam a ser uma preocupação em muitas áreas, mais especificamente na área alimentar, ambiental e médica.

O biofilme corresponde a estruturas formadas por diversos tipos de microrganismos, com predominância de bactérias, que aderem às superfícies. O primeiro passo da formação de biofilmes envolve a ligação de bactérias a superfícies bióticas ou abióticas, nas quais podem estar envolvidas diferentes moléculas microbianas estruturais. Os biofilmes são o estilo de vida mais comum de microrganismos na natureza, sendo estes biofilmes bacterianos especialmente relevantes em clínicas e em vários ambientes industriais (Gutiérrez *et al.*, 2016).

O crescimento celular microbiano é acompanhado pela excreção de produtos de carácter polimérico, polissacarídeos extracelulares (*Extracellular Polymeric Substance* – EPS), que envolvem as células criando uma matriz que atua como escudo protetor das agressões exteriores (Flemming *et al.*, 1997). As EPS têm como principais componentes polissacarídeos, proteínas, fosfolipídeos, ácidos teicóicos e ácidos nucleicos, desempenhando um papel importante na fixação e colonização de microrganismos em superfícies de contacto com alimentos (Shi & Zhu, 2009; Kumar & Anand, 1998).

Os biofilmes podem ser constituídos por uma única espécie microbiana e a sua formação e crescimento é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela sua propagação às células localizadas no interior do biofilme (O'Toole *et al.*, 2000). Fatores como o pH, difusão de oxigénio, fonte de carbono e osmolaridade controlam também a maturação do biofilme (Kasnowski *et al.*, 2010).

Segundo Srey *et al.* (2013), a formação de biofilmes é um processo gradual e dinâmico que é constituído por diferentes etapas: (1) Fixação inicial; (2) Ligação irreversível; (3) Desenvolvimento da estrutura do biofilme; (4) Maturação; (5) Dispersão.

Os microrganismos do biofilme apresentam elevada resistência aos agentes antimicrobianos que os deveriam eliminar, sendo este aspeto um grande desafio nas indústrias alimentares (Srey *et al.*, 2013; Simões *et al.*, 2010).

Pela sua formação em alimentos e utensílios e pela dificuldade na sua remoção os biofilmes tornam-se importantes do ponto de vista da segurança alimentar e da degradação dos alimentos. O tipo de superfícies (natureza química, hidrofobicidade), o seu estado de conservação e a topografia da superfície na qual se formam os biofilmes são parâmetros muito relevantes no crescimento e desenvolvimento deste. Superfícies porosas e irregulares, por exemplo, são zonas favoráveis à formação de biofilmes.

Na indústria dos produtos lácteos, uma incorreta limpeza e desinfecção dos equipamentos e a microbiota transmitida pelo ar são consideradas as maiores fontes de contaminação de leite e produtos lácteos (Srey *et al.*, 2013; Simões *et al.*, 2010; Kumar & Anand, 1998). Nestas indústrias é comum ser aplicado o método CIP (*Cleaning in place*) para a limpeza na linha de produção, mas as limitações deste método pode levar à acumulação de microrganismos na superfície dos equipamentos (Kumar & Anand, 1998). Assim, em conjunto com este método, devem ser aplicados métodos físicos (escovar por ação mecânica), agentes químicos (detergentes) e meios biológicos (enzimas e fagos) para a obtenção de superfícies livres de biofilmes (Shi & Zhu, 2009). Além das superfícies dos equipamentos, zonas como o chão,

locais de escoamento de águas residuais, curvas em tubos, vedantes de borracha, correias transportadoras, aço inoxidável, buna-N e teflon são consideradas locais de formação de biofilmes (Kumar & Anand, 1998).

No ambiente das indústrias de produtos lácteos as bactérias mais isoladas pertencem aos géneros *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (Simões *et al.*, 2010; Srey *et al.*, 2013). No género *Pseudomonas* destacam-se as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* (Kasnowski *et al.*, 2010).

Os microrganismos patogénicos com maior capacidade de se agregarem aos alimentos e às superfícies de contacto de alimentos são *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* O157:H7 (Shi & Zhu, 2009; Simões *et al.*, 2010). Estes microrganismos patogénicos podem contaminar os equipamentos de processamento de leite por contacto direto no ambiente da exploração (contaminação fecal e por úberes de animais infetados) ou através da água utilizada na exploração (Simões *et al.*, 2010).

As bactérias do género *Pseudomonas* são dos mais importantes agentes de deterioração nos produtos lácteos, já que produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas estáveis após a pasteurização e tratamento de UHT. Desta forma, podem causar deterioração no leite pasteurizado durante o seu armazenamento em condições de refrigeração (Simões *et al.*, 2010).

2.5. Problemas associados aos microrganismos psicotróficos do leite

Quando a manipulação do leite ocorre sob condições higio-sanitárias adequadas, a presença de microrganismos psicotróficos limita-se a 10% da microbiota total do leite fresco, enquanto em situações problemáticas pode representar 75% (Nielsen, 2002).

Bactérias psicotróficas são capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C, mas a sua temperatura ótima de multiplicação é mais elevada. Para a maioria das bactérias psicotróficas essa temperatura encontra-se entre os 20°C e os 30°C (Oliveira *et al.*, 2012).

As bactérias psicotróficas proteolíticas são os principais microrganismos responsáveis pela deterioração do leite e dos produtos lácteos, devido à sua capacidade de produzir proteases termoestáveis que hidrolisam a caseína e diminuem o rendimento e a qualidade sensorial dos produtos lácteos (Martins *et al.*, 2005). Algumas bactérias também segregam lecitinasas e lipases que podem desempenhar um papel significativo na deterioração desses produtos (Wiedmann *et al.*, 2000; Dogan & Boor, 2003).

O microrganismo predominante a limitar o tempo de prateleira do leite processado a 4°C é *Pseudomonas* spp., mais especificamente as espécies *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putrefaciens* e *Pseudomonas aeruginosa* (Hu *et al.*, 2016; Dogan & Boor, 2003). A sua capacidade para se multiplicarem e atingirem elevadas densidades celulares em alimentos refrigerados faz com que *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* e *Pseudomonas putida* estejam associadas à deterioração de alimentos de origem vegetal e animal e causem odores desagradáveis quando atingem concentrações acima de 10⁷ UFC/g (Martinez-Rios *et al.*, 2016). A população de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru com números iniciais a rondar os 10⁴

UFC/ml podem exceder os 10^6 UFC/ml quando são armazenados a 7°C por 2 dias ou a 5°C por 3 dias (Law, 1979).

Pseudomonas spp. é um microrganismo aeróbio estrito, não esporulado, Gram-negativo, e é caracterizado na sua forma como bacilos curtos, que apresenta flagelos polares (o que lhe permite ter motilidade). São bactérias não fermentadoras da glucose, em geral são citrocómo oxidase positiva e catalase positiva (Franzetti & Scarpellini, 2007; Arslan *et al.*, 2011).

Todas as espécies do gênero *Pseudomonas* têm necessidades nutricionais muito simples, tendo um grande poder de adaptação, o qual se deve à sua capacidade para produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas (Caldera *et al.*, 2015). Neste gênero as espécies apresentam colônias de morfologia e pigmentação muito diferenciada, sendo frequentemente isoladas em ambientes naturais, tais como solo e água (Franzetti & Scarpellini, 2007).

Este gênero pertence à família das *Pseudomonadaceae* e a sua espécie mais patogénica é *Pseudomonas aeruginosa*, a qual pode provocar infeções respiratórias e urinárias e pode funcionar como bactéria oportunista em pacientes hospitalizados, Habita no solo, água, plantas e animais (incluindo os seres humanos) (Sharma *et al.*, 2014).

2.6. Agentes antimicrobianos - Antibióticos

Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas usadas para combater os microrganismos. Estes podem ser inespecíficos (antisséticos e desinfetantes) ou específicos (quimioterápicos e antibióticos) (Spinosa *et al.*, 2011).

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos), que inibem o crescimento de bactérias, originando a sua destruição. Estes podem ser produzidos unicamente através de processos de síntese química (antibióticos sintéticos) ou através de culturas de microrganismos que são posteriormente modificadas quimicamente (antibióticos semissintéticos) (Burgueras & García, 1998; Spinosa *et al.*, 2011)

Em relação à sua ação sobre as bactérias, o antibiótico pode ser classificado como bacteriostático ou como bactericidas. Nos antibióticos bactericidas podem ser incluídos os antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, glicopeptídeos e rinfampicinas. Nos antibióticos bacteriostáticos incluem-se os macrólidos, as sulfamidas, tetraciclina (Brugueras & García, 1998).

Tendo em conta o modo como atuam nas bactérias os antibióticos podem ser classificados como (1) inibidores da síntese da parede celular bacteriana - penicilinas, (2) antibióticos que alteram a síntese das proteínas - macrólidos, aminoglicosídeos, (3) antibióticos que alteram o metabolismo dos ácidos nucleicos - quinolonas, (4) antibióticos que inibem as vias metabólicas (Tenover, 2006).

A classificação dos antibióticos pode também ser feita em classes: penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, anfenicóis, tetraciclina, polipeptídeos, ploliénicos, macrólidos, aminoglicosídeos, ansamicinas, antraciclina, lincomicina, nucleosídeos, glutarimidas, ionóforos.

A resistência de uma bactéria a antibióticos pode surgir por mecanismos intrínsecos ou adquiridos. Existem mecanismos básicos pelos quais os organismos resistem à ação de agentes antimicrobianos: (1) Alteração da proteína alvo onde o antibiótico se liga,

modificando ou eliminando a zona de ligação; (2) Produção de enzimas, que inativam o antibiótico; (3) Alteração do canal proteico, através do qual o antibiótico entra na célula e por (4) Ativação de bombas de efluxo que expulsam o antibiótico da célula para o exterior (Lambert, 2002; Tenover, 2006).

A resistência das bactérias, através da aquisição de material genético de outras bactérias da mesma ou de espécies diferentes, pode fazer-se por três mecanismos: conjugação (transferência de plasmídeos, que contêm o gene, para outra bactéria através de uma estrutura proteica), transdução (transferência do gene através de bacteriófagos) e transformação (incorporação dos genes por bactérias, após a ocorrência da lise de uma bactéria que contém o gene) (Tenover, 2006).

De forma a verificar a sensibilidade de uma bactéria face a diversos agentes antimicrobianos é realizado um antibiograma, o qual ajudará na terapêutica aplicada por um médico ao doente infetado.

O método de difusão por discos ou método de Kirby-Bauer consiste em medir a inibição do crescimento de um microrganismo inoculado na superfície de um meio de cultura, onde se colocam os discos de papel de filtro impregnado com um agente antimicrobiano de concentração padronizada. Nesta técnica utiliza-se o meio de cultura Mueller Hinton Agar que é inoculado com uma suspensão bacteriana com densidade de 0,5 unidades na escala de McFarland, sobre o meio inoculado são colocados os discos de papel que estão impregnados com diferentes antibióticos com as concentrações pré definidas. A leitura dos resultados é feita após 18 a 24 h de incubação a 37°C.

A presença de antibióticos no leite pode provocar, nos consumidores, diferentes doenças, alergias, distúrbios na flora intestinal e provocar o desenvolvimento de resistências aos antibióticos. Os resíduos de antibióticos também podem modificar ou inibir a fermentação nos produtos lácteos, como no queijo e no iogurte (Nagel *et al.*, 2013). A persistência de resíduos de antimicrobianos no leite varia com o tipo de agente antimicrobiano e de fatores como a dose e via de administração, o excipiente utilizado e a solubilidade (Spinosa *et al.*, 2011).

Os agentes antimicrobianos eficazes para o tratamento de infeções por *Pseudomonas aeruginosa* incluem alguns β -lactâmicos, tais como carbenicilina, ticarcilina, cefalosporinas de terceira geração, o β -lactona aztreonam monocíclico sintético, carbapenems, os aminoglicósidos e as quinolonas. *Pseudomonas aeruginosa* e outras espécies fluorescentes de *Pseudomonas* são geralmente resistentes a antibióticos β -lactâmicos (Arslan *et al.*, 2011).

2.7. Caracterização molecular

2.7.1. Reação em cadeia da polimerase - PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um procedimento rápido que possibilita a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA específicos, a partir de uma quantidade mínima de DNA alvo ou de RNA previamente convertido em cDNA (Lima, 2008). Esta reação resulta na amplificação específica e exponencial de uma determinada região do DNA sintetizada através de dois pequenos fragmentos de DNA especificamente concebidos (*primers* ou oligonucleótidos) que delimitam essa região, para que a polimerase possa iniciar a replicação das cadeias do DNA (Wilson & Walker, 2010; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Uma reação PCR consiste em ciclos repetitivos, constituídos por três etapas: Desnaturação; Hibridação; Extensão.

A primeira etapa consiste na desnaturação do DNA por elevação da temperatura, entre 94 a 96°C, que provoca o rompimento das pontes de hidrogênio que unem as duas cadeias de DNA (Lima, 2008), fazendo assim com que o DNA perca a sua estrutura de dupla hélice (Oliveira *et al.*, 2007). De seguida, ocorre a hibridação do *primer*, ou seja a ligação do *primer* à temperatura de *annealing*, sendo essa temperatura definida pelas características do *primer* aplicado (Lima, 2008). Essa temperatura pode ser determinada com o auxílio de programas de computador específicos para essa finalidade (Oliveira *et al.*, 2007). Por último, ocorre a extensão (*elongation*) da sequência a ser amplificada pela ação da DNA polimerase (Lima, 2008). Esta etapa ocorre a uma temperatura elevada, até cerca de 72°C para que a enzima DNA polimerase se coloque junto dos *primers* que se ligaram anteriormente e com o auxílio do magnésio seja iniciada a síntese de uma nova cadeia. Esta síntese é realizada pela utilização dos nucleótidos (dNTPs) que são adicionados ao tampão (Oliveira *et al.*, 2007). O ciclo é repetido ocorrendo assim a replicação da área amplificada, ou seja em cada ciclo as cadeias complementares de DNA são copiadas pela extensão dos *primers* que se ligam em posições opostas, fazendo com que cada cadeia de DNA recém amplificada seja usada como molde no ciclo seguinte (Lima, 2008), fazendo com que o número de cópias da sequência alvo seja duplicado e existindo um aumento exponencial dessas sequências (Oliveira *et al.*, 2007). O período exato de tempo para o *annealing* depende da velocidade e aquecimento do termociclador, do volume do mix PCR e da concentração do *primer* (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Na técnica PCR são necessários vários componentes, como H₂O, dNTPs, *primers*, DNA polimerase (Taq polimerase), solução tampão, MgCl₂ e o DNA alvo previamente extraído pelo método mais eficaz conforme o tipo de amostra. A água utilizada na reação terá de ser uma água pura esterilizada, isenta de DNAses e RNAses. Os desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) são essenciais na construção de moléculas de ácidos nucleicos, sendo assim um componente necessário no mix de PCR, já que não poderá ser amplificado nenhum novo DNA sem a presença destes na reação. O mix de dNTPs é constituído pelos quatro desoxirribonucleotídeos individuais que constituem uma sequência de DNA (dATP, trifosfato desoxiadenosina; dTTP, desoxitimidina trifosfato; dCTP, trifosfato desoxicitosina e dGTP, trifosfato desoxiguanosina). Estes desoxinucleótidos são adicionados ao mix PCR em quantidades equimolar (dATP / dTTP ou principalmente dGTP / dCTP) (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Os *primers* são pequenas sequências conhecidas de DNA que delimitam e são complementares à região-alvo de amplificação. Estes são sintetizados em laboratórios sendo guardados a -20°C após a sua diluição (Oliveira *et al.*, 2007). Os *primers* são importantes no sucesso do PCR, dado que se forem mal escolhidos pode não se obter qualquer produto PCR ou obter um ou mais fragmentos errados. Existem dois tipos de *primers*: *primer* codificante (*upper primer*), que permite a síntese da cadeia superior, no sentido 5'→3' e o *primer* não codificante, que permite a síntese da cadeia complementar, também no sentido 5'→3'.

As polimerases são as enzimas que catalisam a síntese de moléculas de DNA a partir de um molde, ou seja sintetizam uma nova cadeia de DNA complementar a um molde de DNA ou RNA já existente (Lima, 2008). A Taq polimerase é uma DNA polimerase termoestável, isolada do *Thermus aquaticus*, uma eubactéria termofílica (Cury *et al.*, 2005).

A utilização da solução tampão é uma forma de garantir que os valores de pH e as concentrações iônicas são as adequadas. Este aspeto é importante, já que com o aumento da temperatura no termociclador o pH diminui para 7,4, valor ótimo para a atividade da Taq polimerase à temperatura de 72°C. A concentração de íons de magnésio é importante para a atividade da Taq polimerase e também para a eficiência do *primer*. Esta concentração diminui já que os dNTPs se ligam aos íons de magnésio, sendo assim importante que a concentração esteja em excesso (Cury *et al.*, 2005).

O cloreto de magnésio (MgCl₂) vai ser o co-factor da reação. O DNA alvo será a amostra que contém o segmento a ser amplificado.

Metodologias baseadas na amplificação por PCR de zonas do genoma permitem produzir padrões de fragmentos que podem ser utilizados para identificar e/ou diferenciar organismos. Estas técnicas têm vindo a ter aplicação crescente devido à pequena quantidade de DNA molde necessária, bem como à facilidade e rapidez de execução das mesmas. Assim, técnicas como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) ou AP-PCR (*Arbitrarily primed PCR*), baseadas na utilização de um único *primer* aleatório e temperaturas de *annealing* baixas, bem como a aplicação de *primers* dirigidos para regiões repetidas no genoma, por exemplo MSP-PCR (*Micro/Mini satellite-primed PCR*), têm vindo a ser cada vez mais utilizadas (Lemsaddek, 2008).

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

Entre as técnicas baseadas no PCR, a técnica RAPD é usualmente usada para distinguir microrganismos de certos grupos, para detetar e identificar microrganismos patogénicos, para a tipagem de isolados para fins epidemiológicos e para rastrear as fontes de microrganismos contaminantes na indústria alimentar (Martins *et al.*, 2006)

Esta técnica encontra polimorfismos em sequências de nucleótidos de diferentes organismos, sem a necessidade de informação prévia sobre a sequência analisada. Como é uma técnica baseada em PCR, pequenas quantidades de DNA são suficientes para a análise (Oliveira *et al.*, 2007). O DNA é amplificado numa reação de PCR, usando um só *primer* com uma sequência arbitrária. O *primer* hibrida aleatoriamente com sequências homólogas ao DNA em estudo, originando fragmentos amplificados. O produto é sujeito a eletroforese e, após coloração com brometo de etídio, é visualizado sob luz ultravioleta. Perfis de bandas diferentes indicam sequências diferentes nas moléculas originais de DNA.

RAPD é normalmente realizada, normalmente com um *primer* de dimensões pequenas (10 nucleótidos) que aumenta a possibilidade do encontrar e hibridizar uma sequência oposta. Também, de forma a aumentar a probabilidade da hibridação, a temperatura de *annealing* é mantida baixa, entre 25°C e 42°C. Um dos problemas da análise de RAPD é a fraca reprodutibilidade (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

2.7.2. Biologia molecular na Indústria de produtos lácteos

Na pesquisa de microrganismos psicrotróficos em leite e produtos lácteos é tradicionalmente usado o método de contagem em placa, mas este método torna-se demorado e não permite identificar o potencial de deterioração dos microrganismos presentes. Os microrganismos psicrotróficos estão associados à diminuição do tempo de prateleira dado aos produtos lácteos, existindo uma necessidade de obter métodos rápidos, precisos e sensíveis para a detecção desses microrganismos (Martins *et al.*, 2005).

Os métodos moleculares são sensíveis, específicos e rápidos para a detecção e genotipagem de microrganismos, representando assim uma poderosa abordagem complementar aos métodos microbiológicos clássicos baseados na cultura da amostra. Para desenvolver protocolos que visem à detecção e identificação de *Pseudomonas*, são necessários marcadores genéticos específicos e robustos (Jr *et al.*, 2015)

A técnica de PCR é uma ferramenta poderosa para a análise de grande número de amostras devido à sua simplicidade, versatilidade, sensibilidade e reprodutibilidade. Estudos anteriores indicaram que a PCR pode ser útil para a detecção de bactérias psicrotróficas (Francis *et al.*, 1998).

Machado *et al.* (2013) refere que na detecção de *Pseudomonas fluorescens* a utilização da reação PCR na amplificação do gene *aprX*, torna este método uma alternativa para a avaliação do leite cru. Descreve-se um limite de detecção de 10^6 UFC ml⁻¹ para a amplificação de um fragmento de 194 pb e 10^2 UFC ml⁻¹ para um fragmento de 900 pb. Ainda de acordo com a mesma fonte, apesar de ter uma boa sensibilidade para a detecção de concentrações muito baixas de microrganismos, quando a reação PCR é aplicada na análise do leite cru pode ser afetada pela presença de substâncias inibidoras (Ca²⁺, gordura e proteína). O gene alvo, o tamanho do fragmento amplificado e a microbiota contaminante podem também afetar a sensibilidade da reação PCR quando são analisadas amostras de leite cru (Machado *et al.*, 2013).

2.7.3. Biologia molecular e o género *Pseudomonas*

Com base nas características fenotípicas, as espécies do género *Pseudomonas* do grupo I DNA-rRNA são divididas em dois grupos distintos, segundo a sua capacidade para produzir pigmentos fluorescentes (pioverdinas) ou para acumular nas células inclusões de poli-β-hidroxibutirato (não-fluorescentes) (Ferreira *et al.*, 2009; Franzetti & Scarpellini, 2007).

O género *Pseudomonas* tem sido sujeito a frequentes revisões taxonómicas. Atualmente, este género contém 144 espécies, o que o torna, dentro do grupo das bactérias Gram-negativas, o género com maior número de espécies (Gomila *et al.*, 2015).

As técnicas de hibridização de DNA-rRNA revelaram cinco de homologia de rRNA de *Pseudomonas*. O extenso grau de diversidade entre o antigo género *Pseudomonas* é refletido pela presença de espécies distantemente relacionadas, as quais foram, posteriormente, colocadas em géneros diferentes. Antigas espécies de *Pseudomonas* foram reclassificadas para géneros como *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Aminobacter*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Hydrogenophaga*, *Telluria* e *Stenotrophomonas* (Widmer *et al.*, 1998).

O grupo I rRNA é dividido em três grupos: (1) Grupo fluorescente (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*); (2) Grupo Alcaligenes

(*Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*); (3) Grupo Stutzeri (*Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*). O grupo II rRNA inclui *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia picketti*. O grupo III rRNA inclui *Comamonas acidovorans*, *Comamonas terrigena*, *Comamonas testosteroni*. O grupo IV rRNA inclui *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*. Finalmente, o grupo V rRNA inclui *Stenotrophomonas maltophilia* (Koneman *et al.*, 2006).

3. Material e métodos

3.1. Proveniência e característica dos isolados bacterianos

Neste estudo foram utilizados isolados provenientes de amostras recolhidas numa queijaria do Fundão e nas explorações de leite que fornecem a queijaria. Estes isolados (n=252) foram obtidos entre 2012 e 2016 de amostras de água (n=60) usada na higienização dos equipamentos de ordenha, de amostras de leite cru (n=106) de ovelha, cabra e vaca, de amostras do queijo (n=7), de zaragatoas a superfícies na queijaria (n=78) e de uma cinta de pano (n=1).

Os isolados de água foram obtidos em 2014 e 2015 de amostras colhidas em dezassete explorações de produtores de leite de pequenos ruminantes localizadas no distrito de Castelo Branco, mais concretamente nos concelhos de Belmonte, Covilhã, Fundão, Castelo Branco e Proença-a-Nova. As características das amostras de onde foram obtidos os isolados encontram-se na Tabela 2. Nesta, é possível ver se a água era ou não tratada e qual a sua origem.

Tabela 2 - Referências e origem dos isolados das amostras de água.

Produtor de leite	Ref ^a dos isolados de água	Origem da água / Tratamento
2	196, 197, 198, 199	Nascente / Não
8	200, 201, 202	Nascente / Não
9	203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211	Mina / Não
10	212, 213, 214	Mina Não
17	215, 216, 217, 218, 219	Furo / Furo
20	220	Poço / Sim
26	221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228	Furo / Não
45	229, 230, 231, 232	Rede Pública / Sim
62	233	Barragem / Não
83	234, 235	Furo / Não
85	236, 237, 238	Rede Pública / Sim
87	239	Rede Pública / Sim
97	28, 240	Furo / Não
103	29, 241, 242	Furo / Não
106	30, 243, (243-244)	Rede Pública / Sim
114	31, 244, 245, 246, 247	Nascente / Não
119	32, 248, 249	Nascente / Não

Os isolados de leite cru de ovelha (n=49) foram obtidos em 2015 e 2016, de amostras colhidas em dezanove explorações de produtores de leite de pequenos ruminantes localizadas, maioritariamente, no distrito de Castelo Branco. Na Tabela 3 encontra-se a associação entre os diferentes isolados de leite cru de ovelha e a respetiva exploração leiteira onde foram isolados.

Tabela 3 - Referências dos isolados de amostras de leite cru de ovelha e os respetivos produtores.

Produtor de leite	Ref ^a dos isolados de leite de ovelha
1	117
2	89, 90, 182, 183, 184, 185, 186, 187
8	4
9	91, 92
15	93
17	118
19	5, 94
25	49, 50, 51
26	59
45	95
46	60, 61, 62
68	52, 53
83	6, 96
113	13, 14, 15, 16
120	123, 124, 125
121	97
124	2, 73, 74, 75, 76
126	3, 77, 78, 79
130	80, 81, 82, 83

Os isolados de leite cru de cabra (n=55) foram obtidos em 2015 e 2016 de amostras colhidas em dezoito explorações de produtores de leite de pequenos ruminantes maioritariamente localizadas no distrito de Castelo Branco. Na Tabela 4 encontra-se a associação entre os diferentes isolados de leite cru de cabra e a respetiva exploração leiteira onde foram isolados.

Tabela 4 - Referências dos isolados de amostras de leite cru de cabra e os respetivos produtores.

Produtor de leite	Ref ^a dos isolados de leite de cabra
20	58
66	63
68	10, 11, 12, 54, 55
85	99, 100, 101, 102, 103, 104, 105
87	106, 107, 108, 109
102	64, 65
103	40, 41, 42, 43, 110
106	44, 45, 119, 120
108	121, 122
111	1, 66, 67, 68
114	17, 46, 47, 48
115	69, 70, 71, 72
119	111, 112
122	126, 127
129	18, 19, 56, 57
131	113, 114
132	115
133	116

Quanto aos isolados de leite cru de vaca (n=2, Ref^a 7 e Ref^a 98), estes foram obtidos igualmente em 2015, de uma amostra colhida numa exploração leiteira do distrito de Castelo Branco (Produtor 9).

Os isolados de queijo provêm de amostras da superfície de três queijos com defeitos de cor. Foram obtidos em 2012 e em 2015, de queijos que se encontravam nas câmaras de maturação da queijaria.

Tabela 5 - Referências dos isolados de amostras de queijo.

Amostra de queijo	Ref ^a dos isolados de queijo
Merendeira	27
Queijo de cabra (Lote 080216)	188, 189, 190, 191
Queijo mistura	253, 254

Os isolados provenientes de zaragatoas foram obtidos de manipuladores e superfícies de equipamentos e utensílios (formas grandes, pequenas e perfuradas, pasteurizador, bomba interna, liras, francelas, borboleta, grade laranja, crivos cilíndricos, escovas individuais e da máquina para lavagem do queijo, carrinhos de inox e plástico, doseador de detergente para mãos, interior do tanque de refrigeração, estante).

Tabela 6 - Características dos isolados provenientes das zaragatoas e da cinta.

Superfície analisada	Ref ^a dos isolados de zaragatoas	Data de isolamento
Mãos de manipulador	250, 251	2012
Forma 1	252	2012
Pasteurizador	255	2012
Bomba interna	256, 257	2012
Forma	258, 259	2012
Z6 - Liras da cuba 1	8	24.07.2015
Z10 - Francela da sala de lavagem	9, 129	24.07.2015
Z1 - Grade laranja	20	26.05.2015
Z8 - Forma grande microperfurada	21	26.05.2015
Z1 - Francela da sala de produção	84, 85, 86	09.06.2015
Z2 - Crivos cilíndricos da enchedora	22, 87	09.06.2015
Z7 - Crivos da parte inferior da enchedora	23	09.06.2015
Z9 - Manipulador	24, 88	09.06.2015
Z3 - Manipulador	25, 128	24.07.2015
Z8 - Liras da cuba nº2	26	24.07.2015
Z1 - Escovas da máquina de lavar queijos	130, 131	24.02.2016
Z2 - Francela da sala de lavagem	132	24.02.2016
Z3 - Carrinho inox 1 da sala de lavagem	133, 134, 135, 136, 137, 138	24.02.2016
Z4 - Doseador mãos sala de lavagem	139, 140, 141, 142, 143, 144, 145	24.02.2016
Z5 - Carrinho plástico sala de lavagem	146, 147, 148	24.02.2016
Z6 - Carrinho inox 2 da sala de lavagem	149, 150, 151	24.02.2016
Z7 - Escova individual de lavagem do queijo	152, 153, 154, 155	24.02.2016
Z8 - Forma de queijo grande	156, 157, 158, 159	24.02.2016
Z9 - Forma de queijo pequena	160, 161, 162	24.02.2016
Z10 - Borboleta do tanque refrigeração 4	163, 164, 165, 166, 167	24.02.2016
Z11 - Interior do tanque refrigeração 4	168, 169, 170, 171, 172, 173	24.02.2016
Z12 - Pinha do tanque refrigeração 4	174	24.02.2016
Z14 - Estante da câmara 3	193, 194, 195	24.02.2016
Z15 - Grade laranja do corredor principal	175, 176, 177, 178, 179, 181	24.02.2016
Cinta	192	24.02.2016

Na caracterização molecular foram inseridas duas estirpes de referência: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Ref^a 37) e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (Ref^a 38).

3.2. Preparação das amostras, contagem e isolamento de *Pseudomonas* spp.

Das duzentas e cinquenta e duas culturas bacterianas usadas neste estudo, cento e oitenta e sete culturas foram obtidas em trabalhos anteriores (Domingues, 2015 e Filipe, 2012) e do repositório do Laboratório de Microbiologia da ESACB e as restantes sessenta e cinco culturas foram já obtidas no âmbito deste trabalho, sendo provenientes de quinze zaragatoas a equipamentos e utensílios da queijaria, superfície de um queijo de cabra do lote 080216 com escurecimento superficial, um leite cru de ovelha e uma cinta de pano para envolver o queijo.

Para a preparação das amostras, no caso das zaragatoas foi usada a Norma ISO 18593:2004 –*Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*, tendo sido esfregada a superfície a analisar com uma zaragatoa que foi introduzida dentro de um tubo contendo 10 ml do diluente Triptona Sal (Biokar, Beauvais, França, Ref^a BK014HA) com agentes neutralizantes. O seu transporte para o laboratório foi realizado tendo em atenção os cuidados indicados na norma, nomeadamente a utilização de um recipiente isotérmico que permitisse uma temperatura entre 1°C a 4°C e o transporte no período máximo de 4 h.

O leite e a cinta foram recolhidos em recipientes esterilizados e acondicionados numa mala isotérmica, provida de termoacumuladores de frio, e transportados em condições de refrigeração até ao Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Já no laboratório, a cinta foi mergulhada em 90 ml de solução de Ringer, sendo esta considerada a suspensão-mãe.

A contagem e isolamento de *Pseudomonas* spp., a formulação do meio de cultura *Penicillin and pimaricin agar* (PPA, *Pseudomonas Agar Base*, OXOID Ref^aCM0559, suplementado com *Penicillin G*, Applichem Panreac Ref^a A1837, e *Natamycin*, Sigma-Aldrich Ref^a PHR-1703) a preparação das placas com o meio de cultura e os procedimentos de inoculação e incubação das amostras foram efetuados de acordo com as indicações constantes na Norma ISO 11059:2009 – *Milk and milk products – Method for the enumeration of Pseudomonas spp.*. Das diluições necessárias foi pipetado 0,1 ml para placas de PPA, sendo estas posteriormente incubadas a 25°C por 48 h ± 2 h.

Após o período de incubação, as colónias presentes em cada diluição foram contadas e classificadas segundo as suas características morfológicas (Tabela 12 – Anexo I). Pelo menos uma colónia por tipo morfológico e por amostra foi de seguida repicada para Agar Nutritivo (Liofilchem, Ref^a 610036) de forma a obter-se cultura pura e jovem para posterior confirmação e estudo.

Como provas de confirmação foi realizado o teste da oxidase e a prova de fermentação da glucose. Nalguns casos foi ainda efetuada a observação ao microscópio ótico de esfregaços corados pelo método de Gram.

O teste da oxidase é baseado na produção intracelular da enzima citocromo c oxidase. Na execução deste teste foram usadas as tiras Microbiology Bactident® Oxidase (Merck KGaA, Ref^a 1133000001). Com o auxílio de uma ansa descartável foi aplicada cultura sobre a tira,

esfregando durante 1 min tendo resultados positivos para cores entre roxo e castanho escuro e resultados negativos se não existir alteração de cor ou se se observar uma cor amarela.

A prova de fermentação da glucose permite distinguir entre microrganismos que fermentam e que não fermentam a glucose, observando-se, nos casos em que a prova é positiva, a alteração da cor do meio de roxo para amarelo (Figura 2). Esta prova foi realizada inoculando por picada central um tubo com o meio de cultura segundo a Norma ISO 11059:2009 – *Milk and milk products – Method for the enumeration of Pseudomonas spp.*. O tubo foi depois incubado a 25°C durante 24 h, sendo depois realizada a sua leitura.



Figura 2 - Prova da fermentação da glucose positiva (à esquerda) e negativa (à direita).

3.3. Provas culturais, bioquímicas e antibiograma

Nos casos em que se obteve um resultado positivo para a oxidase e negativo para a fermentação da glucose procedeu-se à crioconservação das culturas e à inoculação dos meios de cultura King B (Biolab, Ref^a KAB20500) e Agar Queijo com e sem tirosina (Carreira *et al.*, 1998; Pintado *et al.*, 2010). Em alguns casos inoculou-se ainda os meios Mueller Hinton agar (Oxoid – Ref^a CM0405) e Agar Sangue (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 43041). Foram ainda selecionadas algumas culturas para identificação por meio da inoculação de galerias API 20NE (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 20050).

3.3.1. Fluorescência no meio King B

No meio King B podemos observar a produção de pigmentos fluorescentes pelas culturas bacterianas. Cada cultura foi assim inoculada no meio de cultura King B e incubada a 22°C durante 24 h a 48 h. Após este período, as placas foram observadas com luz ultravioleta no aparelho SVL, Labnorma 220V, 50 Hz (Figura 3).



Figura 3 - Aparelho de luz ultravioleta, SVL 220V, 50Hz.

3.3.2. Escurecimento no meio Agar Queijo

De modo a testar a capacidade de cada cultura para produzir pigmentos castanhos e escurecer a superfície dos queijos, cada cultura foi inoculado numa placa de Agar Queijo com tirosina e noutra placa de Agar Queijo sem tirosina. Após a inoculação as placas foram incubadas a 25°C durante pelo menos 48 h. O escurecimento dos dois meios foi registado periodicamente ao longo de dois meses.

3.3.3. Suscetibilidade a antibióticos

No estudo da suscetibilidade aos antibióticos foram testados os seguintes antibióticos: ciprofloxacina, enrofloxacina, penicilina G, sulfametoxazol + trimetoprim, gentamicina, imipenem, ceftazidima, ampicilina, piperacilina + tazobactam, oxitetraciclina, estreptomicina e amoxicilina + ácido clavulânico. Estes doze antibióticos, cujas características se encontram na Tabela 7, foram distribuídos por duas placas de Petri.

Tabela 7 - Especificação dos antibióticos utilizados no estudo de suscetibilidade.

	Posição no dispensador	Antibiótico	Características	Grupo
Placa Petri 1	1	Ciprofloxacina	CPI, 5 µg, Oxoid - Ref. CT0425B	Quinolonas
	2	Enrofloxacina	ENR, 5 µg, Oxoid - Ref ^a CT06398	Fluorquinolonas
	3	Penicilina G	P, 10IU, Oxoid - Ref ^a CT0043B	β-lactâmico
	4	Trimetoprim + Sulfametoxazol	SXT, 25 µg, Oxoid - Ref ^a CT0052B	Diamino-pirimidina + Sulfonamidas
	5	Gentamicina	CN, 10 µg, Oxoid - Ref ^a CT0024B	Aminoglicosídeos
	6	Imipenem	IPM, 10 µg, Oxoid - Ref ^a CT0455B	β-lactâmico - Carbapenem
Placa Petri 2	1	Ceftazidima	CAZ, 30 µg, Oxoid - Ref ^a CT0412B	β-lactâmico - Cefalosporinas de 3 ^a geração
	2	Ampicilina	AMP, 10 µg, Oxoid - Ref ^a CT0003B	β-lactâmico
	3	Piperacilina + Tazobactam	TZP, 110 µg, Oxoid - Ref ^a CT0725B	Penicilina semi-sintética + Triazolimetilsulfona
	4	Oxitetraciclina	OT, 30 µg, Oxoid - Ref ^a CT0041B	Tetraciclina
	5	Estreptomicina	S 10, µg, Oxoid - Ref ^a CT0047B	Aminoglicosídeos
	6	Amoxicilina + Ácido clavulânico	AMC, 30 µg, Oxoid - Ref ^a CT0223B	β-lactâmico

Este teste foi baseado na Norma M100S (2016) da *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para este teste foi utilizada a cultura de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

A cultura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi preparada a partir de uma lenticula (Ielab – BAControl-5). Esta foi adicionada a 20 ml de água destilada esterilizada e aguardou-se a dissolução da mesma durante 10 min. Após esse período, 0,1 ml da cultura foi inoculada por espalhamento numa placa de Petri com meio TSA. Repetiu-se o procedimento de inoculação no meio TSA mas agora de uma ansada de 1 µl de cultura. As placas foram depois incubadas a 37°C durante 48 h.

Na realização deste estudo foi utilizada cultura jovem, obtida após inoculação em AN e incubação a 30°C durante aproximadamente 18 h. A cultura de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi incubada a 37°C durante o mesmo período. Com a cultura jovem foi realizada uma suspensão bacteriana com densidade celular equivalente aos padrões 0,5 e 1 da escala de McFarland (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 70900), a qual serviu para inocular a superfície de duas placas com meio de cultura Mueller Hinton Agar. Nessa mesma placa, e com a ajuda do dispensador de discos da marca OXOID (Figura 4), foram distribuídos os discos dos antibióticos. A incubação decorreu durante 48 h, com uma primeira observação às 24 h, a uma temperatura de 28°C (durante os primeiros ensaios) e 30°C (restantes ensaios) durante 24 h.

Após o período de incubação, foi feita a medição dos halos de inibição com uma craveira digital (Metrica, resolução de 0,01mm) (Figura 5) e as culturas bacterianas testadas foram classificadas como sensível – S, intermédia – I e resistente – R aos agentes antimicrobianos testados. Esta classificação foi feita comparando os valores obtidos com os indicados na Norma M100S (2016) (Tabela 8).



Figura 4 - Dispensador de discos da marca OXOID.

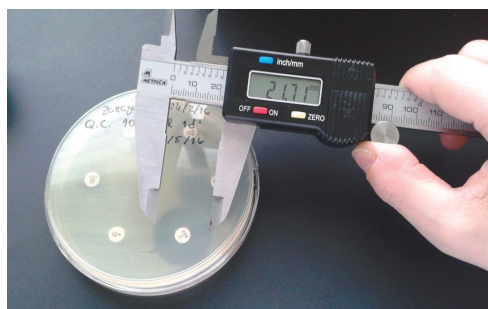


Figura 5 - Medição dos halos em redor dos discos com a craveira digital, após a incubação das placas.

Tabela 8 - Valores padrão (mm) dos diâmetros das zonas de inibição, usados para a classificação das culturas como Suscetíveis (S), Intermédias (I) ou Resistentes (R).

		Antibióticos	S	I	R
Placa de Petri 1	1	Ciprofloxacina	≥ 21	16-20	≤ 15
	2	Enrofloxacina	-	-	-
	3	Penicilina G	-	-	-
	4	Trimetoprim/Sulfametoxazol	-	-	-
	5	Gentamicina	≥ 15	13-14	≤ 12
	6	Imipenem	≥ 19	16-18	≤ 15
Placa de Petri 2	1	Ceftazidima	≥ 18	15-17	≤ 14
	2	Ampicilina	-	-	-
	3	Piperacilina + Tazobactam	≥ 21	15-20	≤ 14
	4	Oxitetraciclina	-	-	-
	5	Estreptomicina	-	-	-
	6	Amoxicilina + Ácido clavulânico	-	-	-

Para o controlo de qualidade dos ensaios foi utilizada a cultura de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os valores padrão dos diâmetros das zonas de inibição esperados para esta cultura estão indicados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores padrão (mm) dos diâmetros das zonas de inibição para o controlo de qualidade usando a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

		Antibióticos	Valores padrão (mm)
Placa de Petr 1	1	Ciprofloxacina	25-33
	2	Enrofloxacina	-
	3	Penicilina G	-
	4	Trimetoprim + Sulfametoxazol	-
	5	Gentamicina	17-23
	6	Imipenem	20-28
Placa de Petri 2	1	Ceftazidima	22-29
	2	Ampicilina	-
	3	Piperacilina + Tazobactam	25-33
	4	Oxitetraciclina	-
	5	Estreptomicina	-
	6	Amoxicilina + Ácido clavulânico	-

Dado estarmos a trabalhar com alguma diversidade de culturas bacterianas, ao longo do estudo os parâmetros aplicados foram sendo adaptados às diferentes culturas. Foram efetuadas repetições sempre que necessário. Por exemplo, houve necessidade de trabalhar com duas temperaturas de incubação (28°C e 30°C), com duas densidades celulares do

inóculo (UFC/ml) (padrão 0,5 e 1 da escala de McFarland), e com o meio de cultura Mueller Hinton agar (sem e com sangue de cavalo desfibrinado). Os ensaios foram realizados em duplicado em alturas diferentes.

3.3.4. Identificação com base no API 20NE

No período de estágio foram realizadas cerca de quarenta e três identificações ao nível da espécie ou do género, após inoculação de galerias bioquímicas miniaturizadas API 20NE. Estas quarenta e três identificações, juntamente com trinta realizadas em estudos anteriores, perfaz um total de setenta e três culturas identificadas.

As culturas selecionadas para identificação provêm de zaragatoas a equipamentos e manipuladores (n= 26), queijos (n= 5), leite de ovelha (n= 8), leite de cabra (n= 6), leite de vaca (n= 1), água (n= 26) e cinta de pano (n= 1).

A galeria bioquímica API 20NE (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 20050) permite realizar cerca de 20 testes: 8 testes convencionais (redução de nitrato, produção de indol, fermentação da D-glucose e hidrólise de L-arginina, ureia, esculina, gelatina e 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) e 12 testes de assimilação (D-glucose, L-arabinose, D-manose, D-manitol, N-acetil-glucosamina, D-maltose, gluconato de potássio, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, citrato de trisódio, ácido fenilacetato). O teste da oxidase deve ser realizado previamente e deverá dar um resultado positivo.

Para a inoculação dos API's foi feita a repicagem de 1 µl das culturas bacterianas selecionadas, entretanto conservadas a -80°C, para o meio de cultura TSYEA ou NA, seguido de um período de incubação de 24 h à temperatura de 30°C. A partir da cultura assim obtida foi preparada uma suspensão bacteriana (0,5 na escala de McFarland).

Os 20 microtubos da galeria API 20NE são compostos por meios de cultura desidratados com substratos específicos que foram inoculados de forma diferente: os 8 microtubos correspondentes aos testes convencionais foram inoculados com a suspensão bacteriana preparada como referido no parágrafo anterior e os restantes 12 testes foram inoculados com a mistura de 200 µl da suspensão bacteriana que sobrou com o conteúdo da ampola API AUX Medium, 7ml (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 20070). Antes da primeira incubação (24 h ± 2 h a 29°C ± 2°C) as cúpulas dos microtubos correspondentes aos testes GLU, ADH, URE foram selados com óleo de parafina (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 70100).

Os resultados foram lidos com o auxílio do quadro de leitura incluído no kit API 20 NE, com base na viragem de cor (nos testes convencionais) e na presença de turvação (nos testes de assimilação). Neste último caso, uma cúpula com turvação indica um resultado de assimilação do substrato positivo e uma cúpula transparente indica um resultado negativo.

A obtenção dos resultados para os testes de redução de nitratos (NO₃) e produção de indol (TRP) envolve os seguintes passos:

- Teste NO₃: é necessário adicionar uma gota de NIT 1 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 70442) e NIT 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 70442) e esperar 5 min. O resultado é positivo se a reação apresentar uma cor vermelha. No caso de um resultado negativo, adicionar pó de zinco e, se após 5 min, o meio continua incolor o resultado para a redução de nitratos é positivo, e se o meio passa de incolor a rosa-vermelho o resultado para a redução de nitratos é negativo.

- Teste TRP: é necessário adicionar uma gota do reagente JAMES (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França, Ref^a 70542), tendo um resultado positivo caso exista uma cor rosa difundida pela cúpula.

Depois da primeira leitura às 24 h, as galerias foram incubadas mais 24 h à mesma temperatura. Após este período, todos os testes (à exceção dos testes de redução de nitratos, de produção de indol e de fermentação da glucose, que têm uma única leitura após 24 h de incubação) foram novamente lidos e registados. Por fim, foi obtido o perfil numérico para cada cultura em processo de identificação, através do qual foi feita a identificação após consulta da base de dados da bioMérieux, disponível *online* em <https://apiweb.biomerieux.com>.

3.4. Caracterização molecular

A caracterização molecular das duzentas e cinquenta e duas culturas foi realizada no laboratório Tec Labs – Centro de inovação, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Foi usada a técnica de *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD), uma técnica de PCR *fingerprinting*, usando os *primers* csM13 e PH.

3.4.1. Extração de DNA

Após crescimento em meio de cultura AN a 30°C retirou-se uma ansada de 10 µl de cultura e adicionou-se a 250 µl de TE com lisozima (10 mg/ml). Incubou-se entre 30 a 60 min a 37°C num bloco de aquecimento (Grant – UBD2 - N^o serie G6 04 19001). De seguida adicionou-se 500 µl de reagente GES (5 M tiocianato de guanidina; 10 mM EDTA pH 8; 0,5% sarcosil), agitou-se por inversão e colocou-se no gelo durante cerca de 5 a 10 min (a lise é confirmada quando a solução fica transparente). Ao tubo anterior foi depois adicionado 250 µl de 7,5 M NH₄Ac frio, agitou-se e colocou-se no gelo durante 10 min, após o que se adicionou 1 ml da mistura 24:1 de clorofórmio (CHCl₃ – Group Carlo Erba Reagents, Ref^a 438603) /álcool isoamílico (C₅H₁₂O – Merck, Ref^a 979) e se misturou o conteúdo do tubo por inversão (apesar do clorofórmio não ser miscível com a água a agitação devia permitir que o mesmo atue sobre os lípidos e proteínas, permitindo a extração). A partir deste passo os tubos não são agitados no Vortex.

Os tubos foram depois centrifugados (Beckman Coulter, Microfuge 18 Centrifuge) a 14000 rpm durante 10 min e recuperados os sobrenadantes para novos tubos (Eppendorf de 2 ml), com cuidado para não arrastar a interfase. Adicionou-se depois volume igual de isopropanol frio e misturou-se suavemente por inversão, podendo nesta fase observar-se a formação de um novelo. Seguiu-se uma centrifugação (14000 rpm, 10 min) e eliminou-se o sobrenadante. Antes de centrifugar de novo (14000 rpm, 10 min) e descartar o sobrenadante, foi adicionado 1ml de etanol a 70% [200 ml = 140 ml de etanol absoluto (CH₃CH₂OH – Panreac, Barcelona, Espanha, Ref^a 121086.1212) + 60 ml H₂O], o qual ficou a evaporar colocando o Eppendorf aberto sobre a bancada. Depois do etanol evaporar, dissolveu-se o conteúdo em 50 µl de TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA).

Após obtenção da amostra de DNA, observou-se uma alíquota de 5 µl em gel de agarose, para avaliar a quantidade do DNA em termos de dimensão média dos fragmentos obtidos. A eletroforese para a quantificação foi realizada nas seguintes condições: gel com agarose (Invitrogen, Paisley, Reino Unido, Ref^a 15510-027) 1,2% em TBE 0,5X (realizado a partir de TBE 5X – Invitrogen, Paisley, Reino Unido, Ref^a LC6678), em tina com TBE 0,5X, estando ligada a uma fonte de energia a 90 V durante 1 h, tendo uma proporção de *gel loading* (10X - Invitrogen, Paisley, Reino Unido) de 1 µl por 5 µl de amostra de DNA. Após observação dos fragmentos de DNA no gel, e quando se julgou necessário, foi realizada uma diluição do DNA com TE (na ordem 1:100 ou 1:1000).

3.4.2. Reação PCR e eletroforese

A caracterização genotípica foi realizada por PCR-*fingerprinting* utilizando-se os *primers* csM13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') e PH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). O *primer* csM13 está incluído no grupo dos *primers* direcionados para regiões flanqueadas ou contendo micro/mini satélites e o PH é um *primer* universal que geralmente é utilizado como a sequência inversa para a amplificação do gene 16S rDNA (Chambel *et al.*, 2007).

O PCR fingerprinting foi realizado usando as seguintes quantidades de reagentes por 1x reação: 18,8 µl de água ultra pura (Gibco, Ref^a 10977-035), 2,5 µl de solução tampão (PCR Buffer Rxn, 10X, MgCl₂ 1,25 ml – Invitrogen, Paisley, Reino Unido, Ref^a y02028), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM MgCl₂ – Invitrogen, Paisley, Reino Unido, Ref^a y02016), 0,5 µl de dNTPs, 0,5 µl *primer*, 0,2 µl Taq DNA Polimerase (5 U/µl – Invitrogen, Paisley, Reino Unido, Ref^a 18038-026) e 1 µl de DNA, perfazendo assim um total de 25 µl de solução por amostra. Em cada Mix foi realizado um controlo (no qual é substituído o DNA por água ultra pura) e 10% de réplicas.

A amplificação foi realizada no termociclador (Biometra – T Gradient e Biometra – T1 Thermocycler) nas seguintes condições: 1 ciclo (95°C por 5 min), 41 ciclos (95°C por 1 min, 50°C por 2 min, 72°C por 2 min) e 1 ciclo (72°C por 5 min) para o *primer* csM13 e 1 ciclo (94°C por 3 min), 35 ciclos (94°C por 1 min, 35°C por 2 min, 72°C por 1 min) e 1 ciclo (72°C por 5 min) para o *primer* PH.

Após a amplificação da amostra, foi feita a corrida das amostras em gel de agarose a 1,2% preparada em TBE 0,5X, sendo a corrida realizada durante 3 h a 90 V com um total de 10 µl de amostra com 2 µl de *gel loading* e o marcador 1 kb *Plus DNA Ladder* (100 pb a 12000 pb) (Invitrogen, Paisley, Reino Unido, Ref^a 10787018). Os géis são depois corados em brometo de etídio, cerca de 10 min, e observados em luz ultravioleta através do aparelho de aquisição de imagem ligado ao programa Alliance 4.7. (Alfagene, Uvitec Cambridge). As imagens são guardadas em formato TIFF para serem analisadas no programa BioNumerics (versão 6.6; Applied Maths, Bélgica) e posterior obtenção dos dendrogramas com base no coeficiente de correlação de Pearson para avaliação das relações de semelhança.

Para análise dos resultados e cálculo da reprodutibilidade (valor médio dos valores de similaridade entre pares de duplicados) foram realizados duplicados para cada *primer*, sendo depois analisada a similaridade entre cada par no dendrograma com base no coeficiente de correlação de Pearson. Ou seja, o valor de reprodutibilidade é representado pelo valor médio dos valores de similaridade entre pares de duplicados.

3.5. Crioconservação a -80°C

Após o isolamento e caracterização prévia das 65 culturas bacterianas obtidas no período de estágio, estas foram crioconservadas utilizando *Skim Milk* (VWR, Ref^a 84615.0500) com glicerol (VWR, Ref^a 24387.292).

A conservação foi realizada a partir de cultura jovem (menos de 24 h de crescimento) repicada em meio LB Agar [Tryptona (10 g/L), NaCl (10 g/L), Extrato de levedura (YE) (5 g/L) e Agar (15 g/L)]. Em cada criotubo foi adicionado 1 ml de *Skim Milk* com glicerol, o qual foi depois inoculado com uma ou duas ansadas de 1 µl de cultura. Cada tubo foi identificado, numerado e armazenado em caixas a -80°C, sendo a conservação realizada para cada cultura em duplicado.

No momento da conservação foi realizado o teste de esterilidade do *Skim Milk*, por espalhamento de 1 ml em placa de LB Agar e incubadas a 25°C durante 24 h.

Todas as restantes culturas usadas neste estudo se encontravam crioconservadas a -80°C pelo método descrito anteriormente.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação com base no API 20NE

Na Tabela 13 do Anexo II, encontram-se os resultados da identificação dos setenta e quatro isolados sujeitos a identificação com recurso às galerias bioquímicas miniaturizadas API 20NE. Verifica-se que nem sempre o género identificado foi *Pseudomonas*, apesar das características das colónias repicadas para confirmação estarem de acordo as características de confirmação para *Pseudomonas*, como referido na Norma ISO 11059 (2009). Na Tabela 10 encontra-se um resumo com todas as identificações efectuadas. Verifica-se que os isolados são pertencentes às famílias *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Xanthomonadaceae*. O género predominantemente identificado foi *Pseudomonas*, com 64,8% sobre o total de identificações e *Pseudomonas fluorescens* foi a espécie predominante com 39,1%. Para o caso particular dos quinze isolados identificados de leite, 73,3% pertenciam ao género *Pseudomonas*, predominantemente à espécie *Pseudomonas fluorescens*. Estes resultados encontram-se de acordo com os resultados obtidos em Arcuri *et al.* (2008), Silva (2005) e Pinto *et al.* (2015). Em Arcuri *et al.* (2008) e Silva (2005), na identificação e caracterização de bactérias psicrotólicas em amostras de leite, 43% dos isolados são do género *Pseudomonas* e 37,6% são da espécie *Pseudomonas fluorescens*. Segundo Dogan & Boor (2003), que recolheram amostras de amostras de leite cru, leite processado e amostras do ambiente de indústrias dos produtos lácteos, obtiveram 51% de identificações para *Pseudomonas fluorescens*, 14% *Pseudomonas putida* e 25% dos isolados teriam identificação como *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas putida*.

Este número mais elevado de *Pseudomonas fluorescens* pode ser associado ao facto de esta necessitar de menor tempo para surgir em temperaturas de refrigeração e também à sua capacidade em formar biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios (Arcuri *et al.*, 2008). Segundo Pinto *et al.* (2015), os isolados de *Pseudomonas fluorescens* destacam-se entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com o maior número de células aderidas por cm² em superfícies de aço inoxidável.

Apesar da elevada percentagem de *Pseudomonas fluorescens* identificadas nas amostras de leite e água, não foi identificada esta espécie nos isolados de queijo sujeitos a identificação, o que pode sugerir menor capacidade de sobrevivência no produto final, relativamente a outras espécies que surgem no queijo como é o caso de *Pseudomonas putida*. Para além do leite, foi possível isolar *Pseudomonas fluorescens* das amostras de água e das zaragatoas e superfícies.

No produto final foi observado que 80% das identificações diziam respeito a *Pseudomonas putida*, uma das outras espécies que, em conjunto com *Pseudomonas fluorescens* está associada à deterioração do leite e dos produtos lácteos. Esta espécie foi identificada a partir de isolados de todas as origens, nomeadamente, da água (35,5%), leite (12%), zaragatoas a equipamentos e manipuladores (23,5%), zaragatoas à casca do queijo (23,5%) e na cinta de pano (6,25%). Assim, a sua presença ou contaminação no queijo pode ser originada logo na exploração, por contaminação dos equipamentos de ordenha que são higienizados com a possível água contaminada e que por consequentemente poderá contaminar o leite, ou através do contacto pelos manipuladores e ou equipamentos da queijaria.

Tabela 10 - Identificação de 74 isolados provenientes de zaragatoas a superfícies, água, leite, queijo e de uma cinta utilizando o sistema de identificação API 20NE.

Espécie (de acordo com API 20NE)	Gênero	Família	Nº de isolados	Água	Leite	Zaragatoas	Queijo	Cinta	% de Identificação do API 20NE
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	2 (2,7%)	0	0	2 (100%)	0	0	55,1%(FD) -99,1% (BI)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	2 (2,7%)	0	1 (50%)	1 (50%)	0	0	71,1% (FD) -99,6% (MBI)
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	3 (4,1%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	0	0	94,1% (FD) - 98,8% (BI)
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	4 (4,1%)	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	0	0	Perfil inaceitável, com possibilidade de ser
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	4 (4,1%)	4(100%)	0	0	0	0	87,7%
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>	<i>Brevundimonas/Oligella</i>	<i>Caulobacteraceae/Alcaligenaceae</i>	4 (4,1%)	2 (50%)	0	2 (50%)	0	0	38,8% (FD) – 88,5% (BI)
<i>Comamonas testosteroni / Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Comamonas/Pseudomonas</i>	<i>Comamonadaceae/Pseudomonadaceae</i>	1 (1,3%)	1 (100%)	0	0	0	0	78,3% (FD)
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	1 (1,3%)	0	0	1 (100%)	0	0	96,8% (BI)
<i>Moraxella spp.</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxellaceae</i>	4 (4,1%)	0	0	3 (75%)	1(25%)	0	82,3% (IA)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2 (2,7%)	1(50%)	1(50%)	0	0	0	99,4% (BI) -99,9% (EI)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	29 (39,1%)	12 (41,3%)	8 (27,5%)	9 (31%)	0	0	71% (EIGP) -99,9% (MBI)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	17 (23%)	6 (35,3%)	2 (12%)	4 (23,5%)	4 (23,5%)	1 (6,25%)	74,3% (BIGP) -99,7% (MBI)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	1 (1,3%)	0	1 (100%)	0	0	0	96.6% (PD)

Legenda: BI- Boa identificação; BIGP – Boa identificação para o gênero *Pseudomonas*; EI – Excelente identificação; EIGP – Excelente identificação para o gênero *Pseudomonas*; IA – Identificação aceitável; FD – Fraca discriminação; MBI – Muito boa identificação; PD – Perfil duvidoso.

Metade dos isolados provenientes das zaragatoas foi identificada como pertencente às espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*. Para além destas, também foram identificados outros tipos de microrganismos, alguns com cariz potencialmente patogénico: *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia gladioli*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Moraxella* spp.. Assim, na indústria deverá haver uma maior atenção aos planos de higienização, se estão a ser cumpridas todas as indicações de utilização pelos fabricantes dos detergentes e desinfetantes aplicados, se são indicados ao tipo de sujidade.

Arcuri *et al.* (2008), que estudaram microrganismos psicrotóxicos em amostras de leite, também identificaram microrganismos dos mesmos grupos taxonómicos que os identificados neste trabalho, nomeadamente, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, *Moraxella* spp., *Alcaligenes faecalis*. Em Silva (2005), também em amostras de leite, alguns dos microrganismos tiveram identificações idênticas às observadas no nosso estudo (*Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia cepacia*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Moraxella* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*).

Nas identificações realizadas foram detetados microrganismos potencialmente patogénicos, tais como *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Moraxella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Por outro lado foi identificada a espécie *Burkholderia pseudomallei* em quatro isolados provenientes de amostras de água de três produtores de leite diferentes. Esta espécie é classificada como altamente patogénica. Segundo Wilcocks *et al.* (2016), *Burkholderia pseudomallei* é um saprófito móvel, Gram-negativo, que habita no solo e nas águas superficiais de países quentes e húmidos, especialmente no sudeste da Ásia e no norte da Austrália. É capaz de infetar uma grande variedade de mamíferos e provoca melioidose, em seres humanos. A patogenicidade manifesta-se como uma doença pulmonar crónica quando as partículas de solo contaminado são inaladas, ou como uma septicemia potencialmente fatal se as bactérias forem introduzidas na corrente sanguínea através de uma punção dérmica. Em zaragatoas à mesma superfície, francela presente na sala de lavagem do queijo, em datas diferentes (a 24 de julho de 2015, Ref^a 9 – Z10-10⁻²-1c e a 24 de fevereiro de 2016, Ref^a 132 – Z2-10⁻²-1a) foi identificado o microrganismo *Achromobacter xylosoxidans*. Esta bactéria pode ser encontrada na água, solo e cresce em solução salina e ambientes molhados (Kim *et al.*, 2008).

Ao realizar a identificação do isolado 137 (Z3- 10⁻¹-1e- Carrinho de inox 1 sala de lavagem de queijo) às 48 horas de incubação apresentava pigmentação típica de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 6), no entanto essa identificação não se veio a confirmar, tendo o seu perfil sido identificado como *Pseudomonas fluorescens*. Essa coloração já se apresenta em meio King B (Figura 7) e em Mueller Hinton (Figura 8), sendo também característico em outros isolados do mesmo tipo de colónia (Figura 9 e Figura 10).



Figura 6 - API 20NE referente ao isolado 137 às 48 horas.

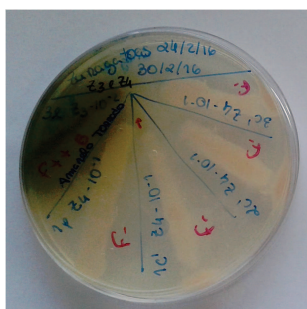


Figura 7 - Placa meio de cultura King B demonstrando o escurecimento de Z3-10⁻²-3e.

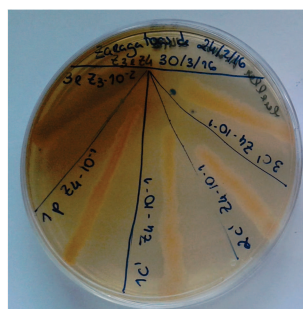


Figura 8 - Placa meio de cultura Mueller Hinton demonstrando o escurecimento de Z3-10⁻²-3e.

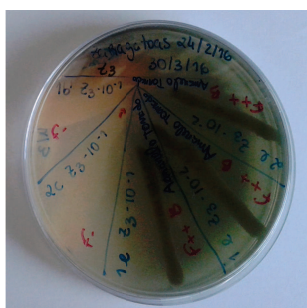


Figura 9 - Placa meio de cultura King B demonstrando o escurecimento de colônias tipo e.

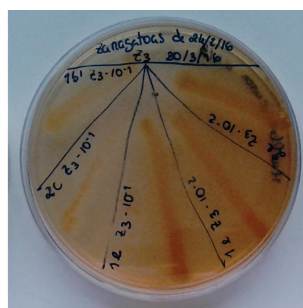


Figura 10 - Placa meio de cultura Mueller Hinton demonstrando o escurecimento de colônias tipo e.

4.2. Suscetibilidade a antibióticos

Os resultados dos antibiogramas foram realizados com base nas normas apresentadas pelo CLSI, segundo as quais o gênero *Pseudomonas* está inserido no grupo das “Other Non-Enterobacteriaceae” e que para este grupo de microrganismo não é recomendado utilizar o método por difusão de discos, já que não foram realizados estudos e reunidos os dados para realizar uma revisão para os valores de referência. Neste estudo optou-se por realizar, na mesma, o método por difusão em discos, sendo realizada a classificação das culturas com base na sua suscetibilidade aos antibióticos usando os valores de referência indicados para *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo este o microrganismo com maior semelhança e pertencendo à mesma família para o qual se fez o isolamento inicial. O uso destes valores de referência pode comprometer os resultados, já que mesmo sendo da mesma família, *Pseudomonas aeruginosa* poderá ter um comportamento diferente às restantes *Pseudomonas*, sendo um microrganismo patogênico com temperatura ótima de crescimento de 37°C.

Segundo o Manual para antibiograma - Difusão em disco (Kirby & Bauer) de 2011, realizado pela equipa do laboratório Laborclin, a FDA recomenda a realização de certos antibióticos para cada tipo de microrganismo, separando os em três grupos: A – antibiótico

de primeira escolha, B – antibióticos de segunda escolha, C – antibióticos suplementares. Para os microrganismos classificados como “*Non-Enterobacteriaceae*” onde está incluída as *Pseudomonas* spp., no grupo A está presente a ceftazidima, gentamicina, tobramicina, piperacilina, no grupo B está a amicacina, aztreonam, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem, merepemen, doripemen, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato, sufazotrim e no grupo C está a cefotaxima, ceftiaxona e o cloranfenicol (Laborclin, 2011).

Neste estudo observou-se que a maioria dos isolados é sensível aos antibióticos ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, piperacilina+ tazobactam (Tabela 11). Em alguns casos os isolados não apresentaram halo, o que indica uma resistência total ao antibiótico. O antibiótico associado a uma maior resistência é a ampicilina com quarenta (60,6%) isolados sem halo, logo a seguir a penicilina G com trinta e nove (60%). Por outro lado, o antibiótico com menor número de casos de resistência total é a gentamicina, com três (4,61%). Observamos assim uma maior resistência deste tipo de isolado aos antibióticos β -lactâmicos (penicilina G e ampicilina), mas, por outros antibióticos com a mesma classificação, por exemplo a ceftazidima e o imipenem, os isolados já apresentam uma elevada sensibilidade. Porém observa-se que antibióticos de outras classes, aminoglicosídeos (gentamicina) e quinolonas (ciprofloxacina) também têm uma grande influência sobre os isolados fazendo com que tenham percentagens de sensibilidade elevadas.

Neste estudo, para os antibióticos nos quais foi possível realizar a classificação (sensível, intermédio, resistente), nenhum isolado apresentou resistência múltipla. Segundo Magiorakos *et al.* (2011) não existe uma definição específica para a classificação de resistência múltipla. A definição usada com mais frequência para bactérias Gram-positivos e Gram-negativos será quando apresentar resistência a três ou mais agentes de classes diferentes.

Tabela 11 - Percentagem dos isolados com classificação Resistente, Intermédio e Sensível para cada antibiótico.

Antibiótico	Concentração (µg)	Testadas	Resistente	Intermédio	Sensível
Ampicilina	10	66	-	-	-
Amoxicilina + Ácido clavulâmico	30	66	-	-	-
Ceftazidima	30	66	1 (1,5%)	0	65 (98,5%)
Ciprofloxacina	5	65	1 ¹ (1,54%)	2 ² (3,08%)	62 (95,38%)
Enrofloxacina	5	65	-	-	-
Estreptomicina	10	66	-	-	-
Gentamicina	10	65	5 ³ (7,69%)	1 ⁴ (1,54%)	59 ⁵ (90,77%)
Imipenem	10	65	12 ⁶ (18,46%)	1 ⁷ (1,54%)	52 ⁸ (80%)
Oxitetraciclina	30	66	-	-	-
Penicilina G	10	65	-	-	-
Piperacilina + Tazobactam	110	66	1 ⁹ (1,51%)	0	65 (98,48%)
Sulfametoxazol + Trimetoprim	25	65	-	-	-

O isolado Z7 10⁻¹ 1c, apresenta uma classificação distinta nos dois ensaios realizados, ficando classificado como Resistente no primeiro e Sensível no segundo ensaio.

² O isolado Z2 10⁻² 1a` e Z4 10-1 3c` apresentam uma classificação distinta nos dois ensaios realizados, ficando classificado como Intermédio no primeiro e Sensível no segundo ensaio.

³ Três destes isolados apresentam classificações diferentes nos dois ensaios realizados: Z3 SM 5a, Z11 10⁻² 1a classificados de Resistente no primeiro e Intermédio no segundo ensaio; Z8 10⁻² 1a classificado de Resistentes no primeiro e Sensíveis no segundo ensaio.

⁴ O isolado Z8 10⁻² 1b`, apresenta uma classificação distinta nos dois ensaios realizados, ficando classificado como Sensível no primeiro e Intermédio no segundo ensaio.

⁵ O isolado Z14 10⁻² 1a`, apresenta uma classificação distinta nos dois ensaios realizados, ficando classificado como Sensível no primeiro e Intermédio no segundo ensaio.

⁶ Cinco destes isolados apresentam classificações diferentes nos dois ensaios realizados: Z3 10⁻¹ 2e, Z11 10⁻² 1g`, P2 10⁻³ 2c classificados de Resistente no primeiro e Intermédio no segundo ensaio; Q.C 10⁻⁵ 1d`, Z3 10⁻¹ 1e classificados de Resistentes no primeiro e Sensíveis no segundo ensaio.

⁷ O isolado Z10 10⁻⁴ 1d``, apresenta uma classificação distinta nos dois ensaios realizados, ficando classificado como Intermédio no primeiro e Sensível no segundo ensaio.

⁸ O isolado Z1 10⁻³ 1e, apresenta uma classificação distinta nos dois ensaios realizados, ficando classificado como Sensível no primeiro e Intermédio no segundo ensaio.

⁹ O isolado Z8 10⁻² 1a, apresenta uma classificação distinta nos dois ensaios realizados, ficando classificado como Resistente no primeiro e Intermédio no segundo ensaio.

Os isolados apresentaram vários comportamentos aos antibióticos, margem inteira (1) ou difusa (2), inibição completa (3) ou parcial (4), apresentaram halos duplos na concentração de inibição (5), contaminantes na zona do halo de inibição (6), crescimento mais acentuado em redor ao halo de inibição (7), resistência total (8) e convergência de halos entre antibióticos (9). Exemplos desses diferentes comportamentos podem ser observados nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

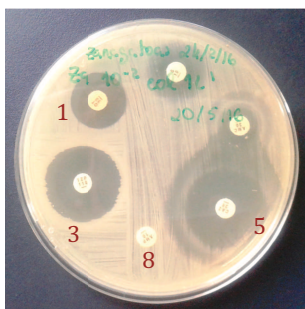


Figura 11 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 9, diluição 10^{-2} , colônia 1l, exemplo de margem inteira (1), inibição completa (3), halo duplo (5) e resistência total (8).

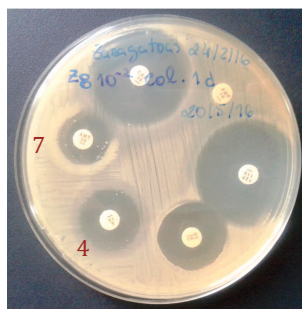


Figura 12 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 8, diluição 10^{-2} , colônia 1d, exemplo de inibição parcial (4) e crescimento acentuado em redor do halo de inibição (7).

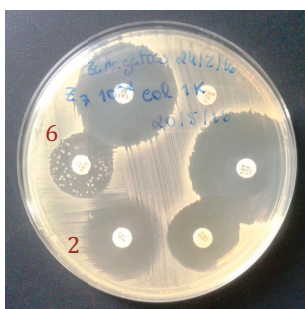


Figura 13 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 7, diluição 10^{-2} , colônia 1k, exemplo de margem difusa (2) e contaminantes na zona do halo de inibição (6).

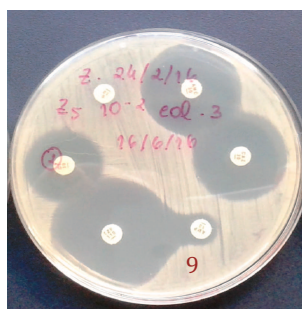


Figura 14 - Placa com o antibiograma do isolado da Zaragatoa 5, diluição 10^{-2} , colônia 3, exemplo de convergência de halos entre antibióticos (9).

Segundo EFSA (2008), os antibióticos ciprofloxacina, ceftazidima, estreptomicina e imipenem (não apresenta informação no uso veterinário), são administrados em seres humanos. A enrofloxacin é de uso veterinário e a penicilina G, o trimetoprim/sulfametoxazol, a gentamicina, a ampicilina, a oxitetraciclina e a amoxicilina/ácido clavulânico são administrados nos seres humanos e de uso veterinário.

Arslan *et al.* (2011), realizaram o teste de suscetibilidade a isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de amostras de queijo, obtiveram maior resistência para o antibiótico penicilina G (100%) e trimetoprim/sulfametoxazol (28,1%) e todos os isolados são 100% suscetíveis a ciprofloxacina, ceftazidima, amicanina, gentamicina e imipenem. Neste estudo, não existiu

resgisto de isolados com resistência múltipla. Em comparação com o estudo realizado em Arslan *et al.* (2011) com os resultados apresentados neste trabalho, não foi obtida uma resistência em todos os isolados para a penicilina G, nem uma sensibilidade de 100% para os antibióticos ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina e imipenem.

4.3. Caracterização molecular

4.3.1. *Fingerprinting* dos isolados

Após reação de PCR realizada com os *primers* PH e csM13 foram obtidos uma grande diversidade de perfis os quais variam no número de bandas e na dimensão de cada banda. Inicialmente realizou-se a amplificação com o *primer* csM13. Este é um *primer* mais universal conduzindo, geralmente, a perfis com número de bandas adequado a comparação de isolados. O grande número de amostras a avaliar e, conseqüentemente, o grande número de géis utilizados não permitiu que o processo de coloração fosse exatamente igual entre géis.

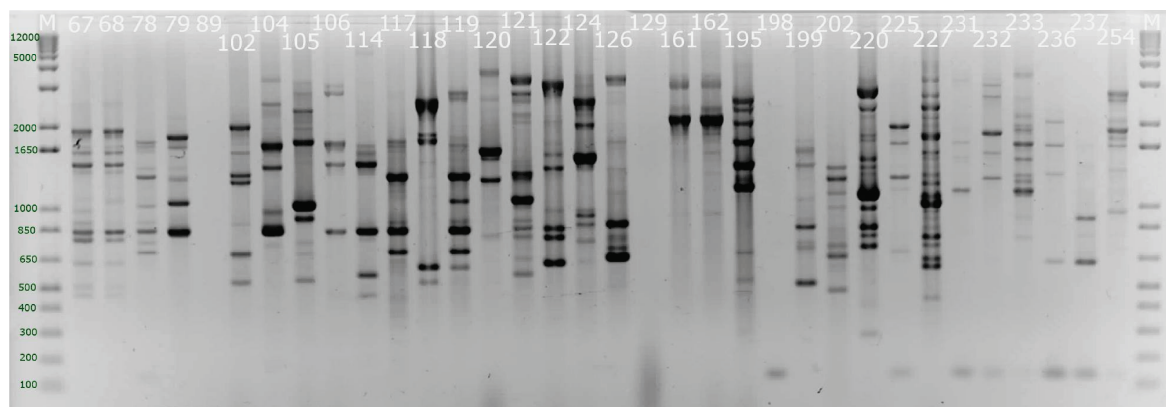


Figura 15 - Exemplo de perfis numerados obtidos com a reação PCR e eletroforese com o *primer* csM13 e marcadores 1 kb Plus (M) de 100 pb a 12000pb.

4.3.2. Avaliação de relação entre as amostras por análise de um dendrograma *composite*

A reprodutibilidade para cada *primer* baseado na similaridade de cada par de duplicados é de 82% para o *primer* PH (Figura 26 – Anexo III) e de 95% para o csM13 (Figura 27 - Anexo III). Como o *primer* csM13 apresenta um elevado valor de reprodutibilidade são excluídos no dendrograma isolados com perfis idênticos (Figura 28 - Anexo III). O valor definido para a linha de corte foi de 82,4% com base no valor de similaridade dos isolados 137 e 138, porque devido à sua origem representam clones.

O valor de otimização e *curve smoothing* são definidos automaticamente a partir dos dados e pretendem minimizar a eventual entropia causada por diferenças experimentais na eletroforese. O valor de otimização foi de 2% (csM13) e 0,5% (PH) e de *curve smoothing* foi de 0% (csM13) e 7,5% (PH).

Nos dois dendrogramas (Figura 26 e Figura 27 - Anexo III) é possível observar que existem pares de réplicas com maior semelhança entre outros isolados do que entre si. Nestes

casos a análise da similaridade foi avaliada par a par, sendo esse o valor utilizado para o cálculo da reprodutibilidade.

A comparação entre os dendrogramas individuais dos *primers* (csM13 e PH) e o dendrograma *composite* (influência de cada *primer* em 50%) é realizada de forma a verificar qual a análise mais diferenciadora.

Numa fase inicial foi realizado um dendrograma incluindo as culturas com Ref^a 37 e 38, que correspondem às culturas de referência. A cultura com Ref^a 37, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC- 27853, apresenta um valor de semelhança de 78,5% com o isolado 233, proveniente de uma amostra de água e identificação através do API 20NE como *Pseudomonas fluorescens*. Apesar de terem uma similaridade elevada, os seus perfis são visualmente diferentes e não estão associados em csM13 e PH. Para a cultura 38, verifica-se uma associação com o isolado 249.

O dendrograma *composite* realizado sem as culturas de referência é constituído por 210 isolados, já que a extração de alguns dos isolados não foi realizada corretamente e não foi obtido perfil na eletroforese com os dois *primers*.

Na análise da similaridade 38,6% (81/210) dos isolados apresentou uma similaridade superior a 85% com o seu par ou pares, valor mínimo em que se considera que os isolados são semelhantes. Esses isolados formam os seguintes grupos: [183-187-182-120], [124-125-123], [14-15], [32-239], [106-107], [67-68], [208-211-205-204-210-209], [243-(243-244)-30], [219-221-222-223-225], [161-162], [196-232], [255-256], [136-150], [10-12], [169-184], [50-218], [71-159], [185-186], [140-144], [139-143], [77-79], [105-189], [147-148], [13-17-3-26], [175-176], [135-154], [20-21], [18-19], [84-85], [80-81], [181-188], [137-138], [216-217] e [69-70].

Apesar de existir uma variedade na amostragem, muitos são os casos onde existe uma grande semelhança na amostra, ou seja existindo só a variação de uma das características (diluição, classificação de colónia diferente e numeração de do tipo de colónia diferente), por exemplo o isolado 137 (Z3- 10⁻¹-1e) e 138 (Z3-10⁻²-2e) têm origem na mesma zaragatoa, de diluições diferentes e do mesmo tipo de colónia. Este facto vai contribuir para que exista um maior número de associações nestas circunstâncias. Os isolados interligados nestas circunstâncias são: [183-187-182], [124-125-123], [14-15], [106-107], [67-68], [208-211-204-205-210-209], [243-(243-244)-30], [219-221-222-223-225], [161-162], [10-12], [185-186], [140-144], [139-143], [77-79], [147-148], [175-176], [18-19], [84-85], [80-81], [137-138], [216-217] e [69-70].

Os isolados dos grupos [124-125-123], [67-68], [243-(243-244)-30], [10-12], [185-186], [140-144], [139-143], [147-148], [175-176], [84-85], [137-138], [216-217] e [69-70] pertencem à mesma amostra e tipos de colónias e por terem valores de similaridade superiores a 85% podemos afirmar que os isolados de cada grupo são semelhantes entre si. Assim tendo a confirmação da identificação de algum dos isolados o seu par ou pares terá grande probabilidade de ser da mesma espécie. No grupo [67-68], o isolado 67 está identificado como *Pseudomonas fluorescens*; no grupo [243-(243-244)-30], o isolado 30 está identificado como *Pseudomonas fluorescens*; no grupo [139-143], o isolado 139 está identificado como *Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis*; no grupo [147-148], o isolado 148 está identificado como *Alcaligenes faecalis* 1; no grupo [84-85], o isolado 85 está identificado como *Methylobacterium mesophilicum*; no grupo [137-138], o isolado 137 está

identificado como *Pseudomonas fluorescens* e no grupo [216-217], o isolado 217 está identificado como sendo *Pseudomonas aeruginosa*. Nos restantes grupos para nenhum dos isolados foi realizada identificação através do API 20NE.

Ao analisar estes grupos podemos verificar que os grupos [140-144] e [139-143] se encontram inseridos no mesmo *cluster*, o qual, na sua maioria, é composto por isolados com origem na zaragatoa realizada ao doseador de detergente para a lavagem de mãos (isolados 139, 140, 143, 144) e um isolado da zaragatoa realizada a um manipulador (isolado 128). Entre os isolados existe uma similaridade de 74,8%, valor inferior ao estabelecido para definir os isolados como sendo semelhantes. Dado os valores relativamente elevados e a identificação idêntica entre o isolado 128 e 139 a probabilidade dos isolados destes *clusters* pertencerem à mesma espécie pode ser mais elevada, apoiada na possibilidade de contaminação pelo contacto direto das mãos do manipulador com o doseador de detergente. Na zaragatoa ao doseador de detergente das mãos (isolado 139) e na zaragatoa ao manipulador (isolado 128), mas em datas de recolha diferentes, foi identificado o mesmo tipo de microrganismo, *Brevundimonas diminuta*/*Oligella urethralis*.

Os grupos [14-15], [106-107], [208-211-205-204-210-209], [219-221-222-223-225], [161-162], [77-79], [18-19] e [80-81] são compostos por isolados provenientes das mesmas amostras, mas apresentando diferentes tipos de colónias. Neste estudo foi observado que a caracterização morfológica das colónias podia modificar-se ao longo do tempo. Acresce ainda que ao longo do período de recolha de amostras, estas foram tratadas por várias pessoas, o que pode influenciar essa caracterização. Apesar disso, estes isolados podem ser considerados semelhantes seguindo o critério da similaridade superior a 85%. No grupo [208-211-205-204-210-209] os isolados 211 e 204 estão identificados como sendo *Burkholderia pseudomallei*; no grupo [136-150] o isolado 136 está identificado como *Moraxella* spp. e no grupo [80-81], apesar de nenhum dos isolados estar identificado, existe uma grande similaridade, 84,1%, com o isolado 82 (identificado como *Pseudomonas fluorescens*) que, apesar da fraca qualidade, apresenta perfis com semelhanças aos isolados 80 e 81. Nos restantes grupos não há isolados com identificações prévias.

No grupo composto pelos isolados [183-187-182-120], os três primeiros isolados pertencem à mesma amostra, leite de ovelha do produtor 2, com diluição diferente e o último isolado é um leite de cabra do produtor 106. A associação do isolado 120 aos outros isolados não é tão esperada, já que o leite é originário de animais diferentes, de produtores e locais diferentes, por isso neste caso pode ser descartado o fator contaminação ou interligação. Através dos perfis obtidos com o primer csM13 pode ser observada uma grande semelhança do isolado 120 com os outros isolados do grupo, enquanto que os perfis obtidos com o primer PH apresentam diferenças. Isto pode ser demonstrado também nos dendrogramas individuais de cada primer, estando o mesmo grupo associado com 89,3% de similaridade no primer csM13 e no dendrograma do primer PH o isolado 120 não está associado diretamente com os restantes isolados, mas pertence a um pequeno *cluster* que está associado com 87,5% de similaridade ao *cluster* dos restantes isolados. Nesta associação foi identificado o isolado 182 como *Pseudomonas fluorescens*, podendo afirmar-se que os isolados são semelhantes e que, os isolados 183, 187 e 120, têm grande probabilidade de serem, também, da espécie *Pseudomonas fluorescens*.

O grupo [32-239] apesar de ser constituído por isolados de amostras de água, estas são de proveniência diferentes, não existindo, aparentemente, qualquer ligação entre elas. O isolado

32 pertence ao produtor 119, sendo uma água de nascente não tratada; o isolado 239 pertence ao produtor 87, sendo uma água fornecida pela rede pública. Estes apresentam uma similaridade entre si de 86% e foram identificados através de galerias API 20NE como *Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis*.

À semelhança do grupo anterior, o grupo [196-232], apesar de ser constituído por isolados de amostras de água, estas foram recolhidas em produtores de leite diferentes não existindo cruzamento entre elas. O isolado 196 é uma amostra do produtor 2, água da nascente sem tratamento, e o isolado 232 é uma amostra do produtor 45 fornecida pela rede pública. Sendo os perfis muito semelhantes foram agrupados a 85,3%. Estando o isolado 196 identificado como *Pseudomonas fluorescens*, existe a probabilidade de o isolado 232 ser da mesma espécie.

O grupo [255-256] apresenta uma similaridade de 98,8% e os dois isolados apresentam identificação de *Pseudomonas putida*. Apesar de não existir contacto direto entre as duas superfícies, estas estão próximas, podendo existir contaminação entre elas pelo ar e por leite que possa contactar com as duas superfícies. Estes isolados têm origem nas zaragatoas ao pasteurizador (255), e à bomba interna (256).

No grupo [136-150] os isolados pertencem a amostras dos carrinhos de inox (1 e 2) que se encontram na sala de lavagem do queijo. Estes carrinhos são utilizados para o transporte e lavagem do queijo. Os isolados têm uma similaridade de 85,5%, estando o isolado 136 identificado como *Moraxella* spp., colocando a possibilidade do isolado 150 ser da mesma espécie.

Os grupos [169-184] e [50-218] estão inseridos no mesmo *cluster* com 81,7% de similaridade. Sendo esta percentagem inferior a 85%, estes grupos foram sinalizados individualmente com 85,3% e 85,4%, respetivamente. Estes grupos incluem amostras de uma zaragatoa realizada ao interior do tanque de refrigeração, leite de ovelha de dois produtores diferentes (2 e 25) e água do produtor 17, estando o isolado 184 identificado como *Pseudomonas putida*. Este facto poderia ser uma confirmação de como existe contaminação da água para o leite e do leite para os equipamentos, mas a amostra de água não contacta diretamente com nenhuma das amostras de leite. No entanto a contaminação entre o leite e o interior do tanque poderá existir, já que tanto o leite, como o tanque poderão estar contaminados por fatores anteriores ao armazenamento do leite.

O grupo [71-159] é constituído por um isolado de leite de cabra, do produtor 115, e por um isolado da zaragatoa à forma do queijo de cabra. Estes apresentam similaridade de 87,1% e não existe identificação prévia para os isolados. A contaminação entre eles pode ocorrer pela persistência do tipo de microrganismo ao longo do processo de fabrico, que surge no leite e no contacto da massa do queijo com a forma.

O grupo [105-189] apresenta um isolado da zaragatoa da casca de queijo e do leite de cabra do produtor 85, tendo estes dois isolados uma similaridade de 92,6%. Os seus perfis genótipos são quase idênticos, existindo algumas diferenças nos perfis do *primer* csM13 e estando identificadas como *Pseudomonas putida*. Estas amostras foram recolhidas em datas diferentes, com cerca de 8 meses de diferença. Isto indica uma persistência deste tipo de microrganismo no processo produtivo, possivelmente por uma higiene inadequada nos equipamentos tanto da exploração como na queijaria, ou pela água utilizada para a

higienização que pode sofrer contaminação através das tubagens que possam conter biofilmes no seu interior.

O grupo [13-17-3-26] é constituído por amostras de leite de cabra do produtor 114 e leite de ovelha do produtor 113 e 126 e zaragatoa à lira da cuba nº2. Estes quatro isolados têm similaridade de 85,5%, sendo que os isolados 3 e 26 têm identificação de *Pseudomonas fluorescens*. O tipo de microrganismo detetado poderá sobreviver ao longo do processo, contaminando as liras na fase de corte da coalhada.

O grupo [135-154] tem 90,9% de similaridade, é constituído por isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* e recolhidos da zaragatoa ao carrinho de inox da sala de lavagem e da zaragatoa das escovas individuais usadas para a lavagem do queijo. Estes dois objetos têm contacto direto no processo de produção e estão inseridos na mesma sala, o carrinho de inox é utilizado como meio de transporte do queijo e por vezes também pode ser realizada a lavagem do queijo no seu interior, onde é colocada água e são utilizadas as escovas para fazer a lavagem. A contaminação entre estes dois objetos é possível, podendo também existir contaminação do queijo e da água utilizada na sua lavagem.

O grupo [20-21] é constituído por isolados que sempre tiveram um comportamento muito semelhante em todos os testes realizados, a sua identificação não foi conclusiva, sendo o resultado “Perfil inaceitável – Possibilidade de *Burkholderia gladioli*”. Estes isolados tem uma similaridade de 95%, que faz com que sejam considerados iguais, apesar de serem de zaragatoas de superfícies diferentes, grade laranja e forma grande perfurada, e não terem contacto direto entre si, a contaminação pode ser transmitida através do queijo que tem contacto direto com as duas superfícies. A forma permite à massa do queijo ganhar formato e a grade serve como base para o queijo ainda fresco depois de este passar pela prensa. Assim, neste caso a contaminação pode ter várias origens, a massa de queijo pode já estar contaminada pelo contacto com outras superfícies quando é colocada na forma, pode ser contaminada pela forma e essa contaminação ser transmitida para a grade, sendo que a contaminação pode prevalecer no queijo até ao fim do processo.

Esse facto pode ser observado no grupo constituído pelos isolados [181-188], com origem numa zaragatoa à grade laranja e numa zaragatoa à casca do queijo. A contaminação teve origem no contacto direto do queijo ainda fresco com a grade, e permaneceu mesmo depois do queijo ser lavado e após o seu tempo de cura. Estes isolados apresentam similaridade de 92,5%, apresentam uma identificação idêntica, *Moraxella* spp. Com uma similaridade de 83,1% está associado um isolado, com origem idêntica ao isolado 181, o isolado 178, com origem na zaragatoa à grade laranja e, possivelmente, com a mesma identificação que os outros dois isolados.

No grupo constituído pelos isolados 80 e 81, encontramos uma grande semelhança entre os perfis obtidos pelo uso do *primer* csM13, mas algumas diferenças entre os perfis obtidos com o *primer* PH, este caso é um exemplo de fraca qualidade nos perfis obtidos. Estes isolados apresentam uma similaridade 89,3%, têm a mesma origem, leite de ovelha (11) do produtor 130, mas foram classificados morfologicamente de forma diferente (a, b), logo morfologias diferentes podem apresentar génotipos idênticos. A nenhum dos perfis foi realizada a identificação, mas estes dois grupos estão associados ao isolado 82 com uma percentagem de similaridade de 84,1%, identificado como *Pseudomonas fluorescens*, existindo a possibilidade dos isolados 80 e 81 também o serem, já que este isolado apresenta um perfil para o *primer* csM13 semelhante.

Considerando os diferentes grupos de isolados semelhantes (similaridade $\geq 85\%$) selecionou-se apenas um representante em alguns dos grupos e construiu-se um dendrograma com base nos dados obtidos com o *primer* csM13 e PH (Figura 16). Os isolados retirados da análise foram 12, 15, 18, 68, 69, 77, 81, 84, 106, 123, 125, 138, 140, 143, 147, 161, 176, 187, 204, 205, 208, 222, 243-244, 255.

O dendrograma *composite* (Figura 16), é constituído por 195 isolados. Em geral, pode ser observado que os *clusters* são compostos por amostras provenientes de diferentes origens e com diferentes identificações. O que mostra que existe uma grande variedade de perfis obtidos no processo de PCR mesmo dentro das amostras com origem semelhante.

Na construção deste novo dendrograma existiu a formação de três novos grupos [223-225-219-221-66], [10-52] e [139-141]. O primeiro grupo apresenta uma similaridade de 88,3%, sendo o isolado 66 com origem numa amostra de leite de cabra do produtor 111 que não possui ligação direta com a água dos restantes isolados dos produtores 17 e 26, representado no dendrograma por (a).

Os isolados 10 e 52, representado no dendrograma por (b), apresentam maior similaridade (86%). Estes isolados tem origem no produtor de leite 68, podendo ter existido contaminação entre estas duas amostras que são de leite de cabra e ovelha.

Por último, o grupo [139-141], com similaridade de 85,5%, representado por (c) no dendrograma. Estes pertencem à mesma amostra, zaragatoa ao doseador de detergente de mãos e da mesma diluição.

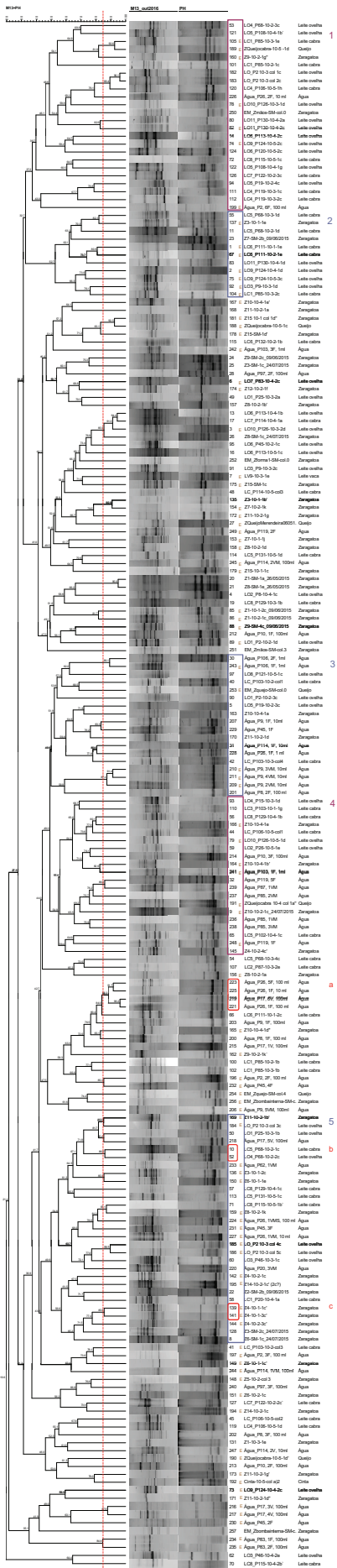


Figura 16 - Dendrograma de similaridade calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson com base nos perfis dos primers csm13 e PH.

4.4. Capacidade de escurecimento e fluorescência de bactérias do gênero *Pseudomonas*

De forma a facilitar a observação do possível escurecimento provocado por cada isolado, estes foram inoculados em meio de cultura Agar Queijo sem tirosina e com tirosina (Figura 17). Este componente é um aminoácido que é importante na produção de pigmentos do tipo melanina. O leite e seus derivados são considerados um dos principais alimentos ricos em tirosina.



Figura 17 - Exemplos de várias tonalidades do escurecimento provocado por alguns isolados estudados, desde de uma tonalidade amarelo limão a um castanho muito escuro (tonalidade negra). Placas superiores: Agar Queijo com tirosina; Placas inferiores: Agar Queijo sem tirosina.

Na Figura 18 podem ser observados os resultados para 199 isolados. Foi feita a contagem de isolados só com resultado positivo para Agar Queijo com tirosina (“com tirosina”), só com resultado positivo para Agar Queijo sem tirosina (“sem tirosina”), positivo nos dois meios Agar Queijo com e sem tirosina (“Ambos”), resultados negativos mas que apresentavam uma coloração amarela (“Amarelos”) e resultados negativos com indicação de apresentarem coloração negativa (“Negativos”).

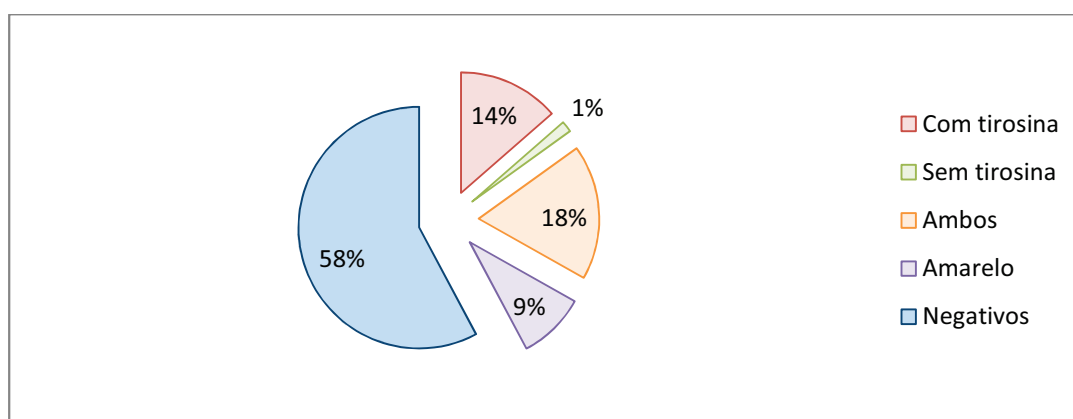


Figura 18 - Gráfico representativo dos resultados do escurecimento em Agar Queijo dos isolados de leite, água, zaragatoas a equipamentos, manipuladores e casca de queijo, leitura realizada às 48 h.

Observa-se uma maior percentagem (58%) nos resultados negativos, o que poderia indicar que as culturas estudadas neste trabalho não teriam muita influência no escurecimento dos queijos. Esta leitura foi realizada às 48 h o que, para alguns casos, poderá ser um período insuficiente para o aparecimento de alteração de cor.

Como era de esperar existem mais isolados com resultado positivos só para o meio de cultura com tirosina.

Nas figuras seguintes (Figura 19 e 20), da mesma forma que na figura anterior foi feita a contagem de isolados só com resultado positivo para Agar Queijo com tirosina (“com tirosina”), só com resultado positivo para Agar Queijo sem tirosina (“sem tirosina”), positivo nos dois meios Agar Queijo com e sem tirosina (“Ambos”), resultados negativos mas que apresentavam uma coloração amarela (“Amarelos”) e resultados negativos sem indicação de apresentarem coloração negativa (“Negativos”), para os 65 isolados das zaragoas a equipamentos, manipuladores e casca de queijo, leite e cinta da colheita realizada no dia 24 de fevereiro de 2016, com leitura feita às 48 h e aos 21 dias.

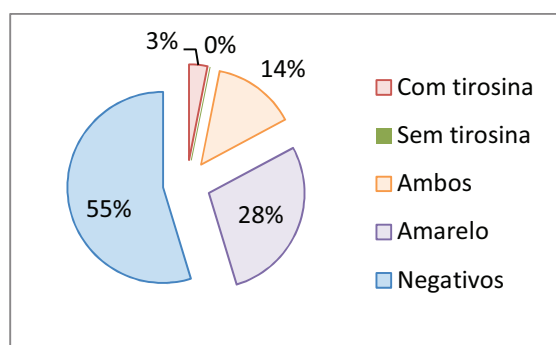


Figura 19 - Gráfico representativo dos resultados do escurecimento em Agar Queijo dos isolados das zaragoas, leite e cinta da recolha do dia 24 de fevereiro de 2016, com leitura realizada às 48 h após a inoculação.

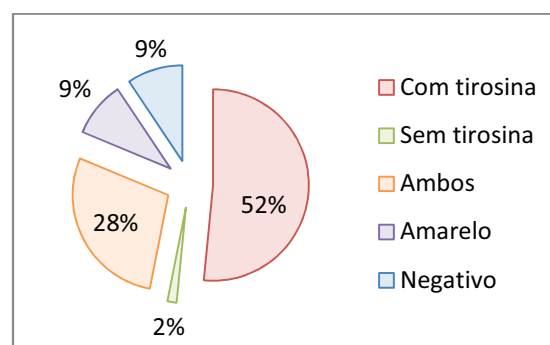


Figura 20 - Gráfico representativo dos resultados do escurecimento em Agar Queijo dos isolados das zaragoas, leite e cinta da recolha do dia 24 de fevereiro de 2016, com leitura realizada 21 dias após a inoculação.

Com estas duas leituras podem ser observadas as mudanças existentes ao longo do tempo. Para estes isolados no Anexo IV, Tabela 14, podem ser observadas as imagens da evolução do escurecimento, na leitura às 48 h, 8 dias e 21 dias.

Algo que é notório nos dois gráficos é a categoria que domina em cada um deles. No primeiro observa-se a dominância de resultados “negativos” (55%), já no segundo gráfico são os resultados “com tirosina” (52%) que dominam, o que nos indica que os isolados poderão provocar escurecimento, mas necessitam de mais algum tempo e até mesmo de uma quantidade mais elevada de tirosina para que se manifestem. Este escurecimento pode até nem se manifestar, já que em condições normais sem adição de tirosina não existiu escurecimento.

Um resultado positivo em meio de cultura sem tirosina juntamente a um resultado negativo no meio de cultura com tirosina não é muito frequente, mas existiu o aparecimento de um isolado (2%) com esse resultado na leitura aos 21 dias.

De um gráfico para o outro é observado o aumento de resultado positivo em ambos os meios de 14 % para 28%, o que é normal que aconteça já que isolados que inicialmente só apresentariam resultados positivos no meio de cultura com tirosina, ou que sejam negativos ou até os isolados que apresentavam cor amarela, poderão manifestar um escurecimento mais tardio. Mesmo existindo este aumento, foi observado que alguns isolados que apresentavam escurecimento às 48 h, ao longo do tempo esse escurecimento desaparecia. Uma leitura apenas às 48 h pode ser insuficiente sendo aconselhado fazer um

acompanhamento do desenvolvimento do escurecimento mantendo as placas nas condições mais próximas da cura e/ou acondicionamento do produto final.

Os isolados que apresentaram pigmentação amarela limão no meio de cultura Agar Queijo apresentaram fluorescência no meio de cultura King B. Este amarelo limão era característico em 28% dos isolados na leitura realizada às 48 h e é também característico no início da maturação do queijo. Esse amarelo diminui de intensidade ao longo do tempo, chegando a desaparecer ou evolui para um pigmento mais escuro. Nas imagens seguintes pode ser observado que o amarelo demonstrado no isolado da cinta de pano que envolve os queijos é idêntico ao que aparece nos queijos no início da maturação.

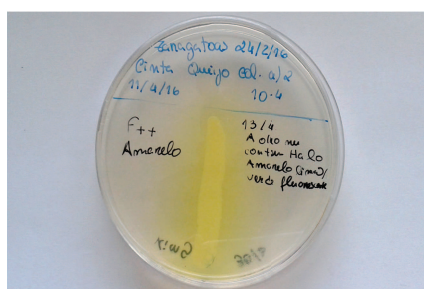


Figura 21 - Isolado originário da cinta de pano em meio de cultura King B.

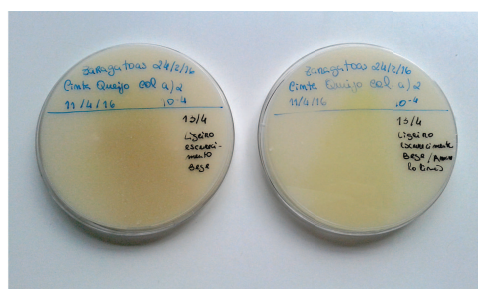


Figura 22 - Isolado originário da cinta de pano em meio de cultura Agar Queijo com tirosina (direita) e Agra Queijo sem tirosina (esquerda).

O aparecimento de escurecimento não segue um padrão, nem regras, mas pode observar-se uma maior incidência em colónias tipo c, d, e (ver caracterização na Tabela 12, Anexo I), F (Fluorescente) e VM (Vermelha).

Foi observado escurecimento em cento e cinco isolados, dos quais 46,8% (46/105) são de zaragatoas realizadas a equipamentos e manipuladores, 27,6% (29/105) são das águas recolhidas nas explorações de leite, 20,9% (22/105) são das amostras de leite (ovelha n=15, cabra n=6, vaca n=1), 6,7% (7/105) são de zaragatoas realizadas às cascas de queijos que apresentavam escurecimento e 0,9% (1/105) são de um isolado pertencente a cinta de pano utilizada para envolver os queijos. Neste isolados é mais uma vez observada grande diversidade de amostras, a água e leite são originários de vários produtores e nas zaragatoas observa-se a presença de isolados com capacidade para provocar escurecimento em quase todos os equipamentos e manipuladores analisados.

Os isolados de água e leite são de vários produtores, o que faz com que a contaminação de espécies que tenham a capacidade de provocar escurecimento nos queijos tenha várias origens, facto que pode provocar uma contaminação mais alargada no processo e num maior número de lotes do produto final.

Entre os isolados que apresentam capacidade de provocar escurecimento estão identificadas: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomalei*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Este resultado mostra que o escurecimento não é só uma característica exclusiva de microrganismos do tipo *Pseudomonas*.

Na observação do dendrograma de similaridade dos isolados que provocaram escurecimento em Agar Queijo (Figura 30 - Anexo V), os grupos de isolados com similaridade superior a 85% foram igualmente observados no dendrograma *composite*. Os *clusters* são constituídos por isolados com diferentes origens e os isolados que provocam escurecimento estão distribuídos por vários dos *clusters* do dendrograma *composite*.

A fluorescência das colônias pode apresentar intensidade e coloração diferente (Figura 23 e Figura 24). Esta é manifestada sob luz ultra UV. Os isolados no meio King B podem apresentar um halo de cor amarelo limão (Figura 25).



Figura 23 - Placa com isolados com fluorescência (1° e 4° isolado) e com fluorescência mais fraca (2° isolado) e sem fluorescência (3° e 5° isolado).



Figura 24 - Placa em que todos os isolados apresentam fluorescência.

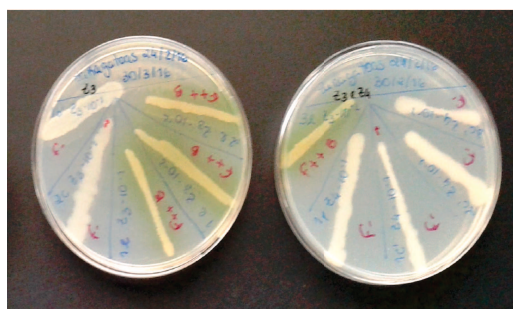


Figura 25 - Placa de King B onde os isolados apresentam cor amarelo limão em redor e sobre o crescimento.

A fluorescência foi caracterizada num total de duzentos e trinta e cinco isolados em que cento e catorze isolados não apresentaram qualquer tipo de fluorescência, oitenta e seis isolados apresentam fluorescência F+, vinte e nove isolados apresentam fluorescência F++ e seis isolados apresentavam fluorescência F+++.

Os isolados apresentaram várias tonalidades de fluorescência: amarelo limão, branco, branco amarelado, branco azulado, branco/lilás. Neste estudo podemos observar que nem todos os isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* apresentam fluorescência e os que apresentam fluorescência a sua tonalidade pode variar entre branco e amarelo. A fluorescência é mais evidente nas amostras de leite e dois dos sete isolados das zaragatoas à casca do queijo não apresentam fluorescência.

Segundo Martin *et al.* (2011), *Pseudomonas fluorescens* foi a única razão para a deterioração do tipo de queijo do seu estudo (queijo ao estilo latino). Neste artigo é também referido que o pigmento azul produzido por *Pseudomonas fluorescens* causa deterioração em queijo *Mozzarella*.

Analisando o dendrograma da Figura 30 (Anexo V) verifica-se que os isolados com capacidade de produzir fluorescência se encontram mais frequentemente em *clusters* a que também pertencem isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*.

4.5. *Pseudomonas* spp. - da matéria prima ao produto final

A variedade na amostragem do estudo foi obtida de forma a perceber a possível interligação entre os isolados ao longo do processo, perceber as possíveis vias de contaminações ao longo do processo de produção do queijo.

Na exploração a influência de uma água contaminada que é utilizada na higienização dos equipamentos de ordenha e de outros utensílios que possam estar em contacto direto com o leite, a higienização desses mesmos equipamentos e utensílios que não sendo eficaz poderá facilitar as condições para a formação de biofilmes, o que será transmitido para o leite no período antes do seu processamento. Na queijaria, a higiene de todos equipamentos, utensílios e mãos de manipuladores que tenham contacto direto com o leite e com o queijo.

Para avaliar essas possíveis relações analisaram-se o dendrograma *composite* constituído com os isolados testados e os dendrogramas construídos com base nos isolados das amostras de leite e água do mesmo produtor (Figura 31 à 43 – Anexo V) e um constituído apenas pelos isolados com identificação fenotípica como pertencentes ao género *Pseudomonas* (Figura 44 – Anexo V).

Na observação do dendrograma da Figura 16, são várias as associações que nos indicam uma contaminação ao longo do processo. Não nos permitindo detetar a origem exata do problema deverá ser tomada atenção a todos os envolventes e possíveis pontos de formação de biofilme de modo a eliminar ou minimizar os prejuízos tidos pelo aparecimento do escurecimento e deterioração do queijo.

Nesse dendrograma podemos também observar a associação entre diferentes tipos de isolados com diferentes datas de recolha o que pode indicar uma semelhança entre eles. Diferentes associações são visíveis: (1) amostras de água de produtores diferentes que não poderão ter contacto entre si estão associadas (representado por 4 no dendrograma), (2) amostras de água utilizadas nas explorações dos produtores de leite com zaragatoas de equipamentos da queijaria que não têm contacto direto, mas a possível contaminação entre elas pode ter como meio de transmissão o leite (representado por 3 no dendrograma), (3) amostras de leite de produtores diferentes, estas amostras são tratadas individual durante a sua ordenha (momento em que foi realizada a sua recolha) mas na queijaria poderá ocorrer a sua mistura para o seu processamento (representado por 1 e 2 no dendrograma), (4) amostras de água e leite tendo como origem produtores diferentes (representado por 1 e 5 no dendrograma). Todos os outros *clusters* são constituídos por mais que um tipo de associação confirmando que a contaminação entre os envolventes pode ser possível. O facto de serem amostras recolhidas em datas diferentes, para estudos diferentes e com incidência de forma individual, pode ter sido vantajoso para indicar a persistência de estirpes de microrganismos ao longo do tempo, mas pode não ser a forma mais correta e absoluta para perceber se existe contaminação ao longo do processo. Essa falha pode ser colmata ao realizar um acompanhamento mais rigoroso do processo para obtenção de um certo lote de queijo, ou seja, realizar recolha:

- Amostras da água que será usada para higienizar o equipamento de ordenha e outros na exploração,
- Zaragatoas antes e após lavagem e desinfeção dos equipamentos,
- Se possível recolher amostras de leite diretamente do animal e após o seu armazenamento na exploração, transporte para a queijaria e armazenamento

na queijaria antes do seu processamento e realizar zaragatoas aos equipamentos pelo qual teve contacto direto,

- Na queijaria também deverão ser realizadas as zaragatoas aos equipamentos e manipuladores que têm contacto direto com o leite com o queijo,
- Ao queijo realizar zaragatoas à casca ao longo do processo de maturação.

De forma a perceber se a água na exploração de leite, utilizada principalmente na higienização do sistema de ordenha influencia a contaminação do leite, foi realizado o estudo de similaridade entre as amostras de leite e água recolhidos no mesmo produtor. Esse estudo foi possível realizar em 13 produtores (2, 8, 9, 17, 20, 45, 83, 85, 87, 103, 106, 114, 119). No caso das amostras para os produtores 2, 103, 106 e 114 demonstram alguma similaridade entre as amostras de água e leite, mesmo que os valores não sejam muito elevados. Nos restantes produtores existe um afastamento entre as amostras. Por serem amostras recolhidas com algum tempo de diferença pode contribuir por não existir grande similaridade entre isolados. Essa similaridade baixa pode, também ser explicada pela possibilidade de existir uma barreira no processo que impeça a contaminação entre cada higienização do material de ordenha e armazenamento do leite e por, a contaminação do leite poder ocorrer por doença e sujidade do animal.

Na identificação realizada aos isolados da água utilizada no local de produção de leite, foi obtido um isolado de *Pseudomonas putida* (197) e um de *Pseudomonas fluorescens* (196), a qual também é identificada no leite. Sendo estas espécies formadoras de biofilme, a limpeza e desinfeção com água contaminada poderá aumentar a probabilidade de estas se instalarem e desenvolverem nos equipamentos (de ordenha e armazenamento do leite) no período de tempo entre cada utilização. Após este período, o contacto do leite com estes equipamentos poderá proporcionar a sua contaminação, dado que por vezes o leite poderá ficar armazenado nos tanques de refrigeração por 24 h.

Na recolha do dia 24 de fevereiro de 2016, para além das zaragatoas foi recolhida uma amostra de leite cru de ovelha do produtor 2, uma cinta para envolver os queijos e feita uma zaragatoa da casca do queijo do lote 080216 (isolados realizada identificação 182, 184, 188, 189, 191, 192) nas quais pode ser observado uma identificação de *Pseudomonas putida* que abrange as três origens, existindo a possibilidade de transmissão entre cada origem.

Das identificações realizadas vemos que o género *Pseudomonas* foi o mais frequente na realização do API 20NE. Na análise da similaridade entre os isolados para os quais se observou identificação para espécies de *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*) (Figura 44 - Anexo V) continua a existir uma associação de isolados com diferentes origens.

Nesse estudo de similaridade podem ser observados quatro grupos com similaridade superior a 85%, [105, 189], [255, 256], [135, 154], [3, 26], onde todos são constituídos por amostras de origens diferentes mas que estão interligadas no processo. Estes grupos já tinham apresentado valores de similaridade superiores a 85 % no dendrograma *composite*.

Em comparação do dendrograma constituído só por isolados pertencentes ao género *Pseudomonas* (Figura 44 – Anexo V), com o dendrograma da Figura 16, no primeiro fica demonstrado que a mesma espécie pode apresentar diferentes perfis quando aplicado o mesmo *primer*, existindo a formação de mais do que um *cluster* com isolados com a identificação para a mesma espécie, já o segundo dendrograma permite prever e identificar a

espécie de isolados que estejam próximos e com grau de similaridade com as espécies já identificadas, prevendo assim um maior número de isolados com identificação para o gênero *Pseudomonas*.

5. Conclusão

Após a realização deste trabalho concluímos que as espécies que predominaram nas identificações efetuadas foram *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, as quais representaram 95,7% das bactérias identificadas como *Pseudomonas*. Destas, a espécie *Pseudomonas putida* foi a única que mostrou uma presença transversal a todas as origens (água, leite, ambiente e queijo). Sendo uma espécie com potencial para formar biofilmes, esta característica poderá justificar a sua presença ao longo da cadeia de produção do queijo. O elevado número de bactérias das espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* com origem nas amostras de água, leva-nos a pensar na necessidade de fazer um acompanhamento aos produtores de leite cru, sensibilizando-os para a importância da qualidade da água usada nos processos de higienização do material e equipamento de ordenha. Em muitas explorações de leite continua a ser usada água não tratada e de deficiente qualidade.

No decorrer da identificação dos isolados foi observado o aparecimento de outros tipos de microrganismos, para além de bactérias do género *Pseudomonas*, muitos dos quais também provaram ter capacidade para provocar manchas escuras na casca do queijo. Estes são microrganismos a ter atenção em próximos estudos. Os microrganismos caracterizados como potencialmente patogénicos foram detetados em amostras de todas as origens.

De uma forma geral, os isolados de bactérias tipo *Pseudomonas* demonstraram ser suscetíveis aos antibióticos. Observou-se resistência a dois antibióticos, nomeadamente penicilina G e ampicilina, que são administrados nos seres humanos e em casos veterinários. Os isolados demonstram assim maior resistência a antibióticos do tipo β -lactâmico, mas sem apresentarem resistência múltipla.

Na análise das relações de similaridade entre isolados, conclui-se que *Pseudomonas* spp. se encontra disseminada por todas as origens, já que não ocorreu a formação de *clusters* constituídos por isolados de uma só origem. A grande quantidade de *clusters* demonstra uma grande diversidade de perfis entre as espécies, não existindo o agrupamento em *clusters* de isolados pertencentes à mesma espécie.

Os isolados com capacidade de provocar escurecimentos nos queijos, também se encontram disseminados por todas as origens de amostras e distribuídas ao longo de todos os *clusters* formados no dendrograma *composite*. No estudo do possível escurecimento provocado pelas culturas, para 199 isolados, numa leitura às 48 h obteve-se 33% de isolados com escurecimento (14% com tirosina, 1% sem tirosina e 18% em ambos), 58% negativos e 9% dos isolados apresentavam pigmento amarelo. Este pigmento aparece, em alguns casos, antes do aparecimento de um pigmento mais escuro. Alguns isolados não apresentam escurecimento na leitura das 48 h, pelo que se sugere que este estudo seja prolongado por mais algum tempo.

Sem uma origem específica de contaminação é importante manter um controlo ao longo de todo o processo, não descorrendo a higienização na exploração de leite. Neste local dá-se início à manipulação da principal matéria-prima do queijo. Assim, seria importante um acompanhamento e aconselhamento ao produtor de leite fase à higienização da exploração e animais, e da importância que a qualidade da água utilizada na exploração para a higienização da sala e equipamentos de ordenha têm na qualidade do leite. Na queijaria, seguir boas

práticas de fabrico e higienização de forma a criar barreiras para que a contaminação não se prolongue na cadeia de produção.

No planeamento inicial deste estudo, um dos objetivos passaria pela concretização de estudos de eficácia dos desinfetantes. Esses desinfetantes seriam uma das barreiras à contaminação. Seria oportuno realizar esse estudo não só com os desinfetantes utilizados na queijaria mas também com os desinfetantes utilizados pelos produtores de leite. Estes resultados permitiriam perceber se as medidas aplicadas na higienização são eficazes como estão a ser aplicadas ou se teria de existir melhoramento nos planos de higienização.

O facto de as amostras não serem recolhidas nos diferentes pontos da cadeia de produção na mesma altura, pode ser uma das limitações deste trabalho. De outra forma seria possível observar de uma forma sólida se existe contaminação ao longo do processo de produção e criar bases da existência de persistência do mesmo tipo de microrganismos ao longo do processo de produção.

Por último, este trabalho permitiu concluir que é essencial continuar a estudar a problemática associada ao escurecimento dos queijos, sendo este trabalho uma boa base de partida. Sendo um tema complexo, que envolve diferentes microrganismos (*Pseudomonas* e géneros afins, estudados neste trabalho, mas também leveduras e fungos filamentosos), com produção de diferentes tipos de pigmentos e com diferentes vias bioquímicas envolvidas, será necessário a envolvimento de grupos de trabalho multidisciplinares que permitam concretizar, o mais rapidamente possível, o objetivo de conhecer os fatores que condicionam o escurecimento e o seu controlo.

6. Referências Bibliográficas

- Arcuri, E. F., Silva, P. D., Brito, M. A., Brito, J. R., Lange, C. C., & Magalhães, M. M. (2008). Counting, isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from refrigerated raw milk. *Ciência Rural*, 38 (8), 2250-2255.
- Arslan, S., Eyi, A., & Ozdemir, F. (2011). Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal Dairy Science*, 94, 5851-5856.
- Bore, E., & Langsrud, S. (2005). Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkylamine and peracetic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 96-105.
- Brugueras, M. C., & García, M. M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14 (4), 347-361.
- Caldera, L., Arioli, S., Stuknyte, M., Scarpellini, M., & Franzetti, L. (2015). Setup of a rapid method to distinguish among dead, alive, and viable but not cultivable cells of *Pseudomonas* spp. in mozzarella cheese. *Journal Dairy Science*, 98 (12), 8368-8374.
- Carreira, A., Paloma, L., & Loureiro, V. (1998). Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes`cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 223-230.
- Cenci-Goga, B., Kamara, M., Sechi, P., Iulietto, M., Novelli, S., & Mattei, S. (2014). Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of Mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Dairy Science*, 97, 6708-6718.
- Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., Jordan, S., Perni, S., Shama, G., Adrião, A., Faleiro, L., Requena, T., Peláez, C., Andrew, P., Tenreiro, R. (2007). Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow`s milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 52-63.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100S, 26ª Edição.
- Cury, P. R., Furuse, C., & Araújo, N. S. (2005). Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. *Revista Odontológica de Araçatuba*, 26 (2), 34-39.
- Decreto Regulamentar nº 22/88 de 25 de Maio (1988) - Queijos produzidos na Beira Baixa.
- Decreto Regulamentar nº 39/87 de 29 de Junho (1987) - Referente ao Queijo de Serpa.
- Decreto Regulamentar nº 42/85 de 5 de Julho (1985) - Referente ao Queijo Serra da Estrela.
- Decreto Regulamentar nº 49/86 de 20 de Outubro (1986) - Regulamenta a criação das regiões demarcadas do queijo da Região Demarcada do Queijo de Azeitão.

Decreto Regulamentar nº 6/93 de 16 de Março (1993) - Referente ao Queijo de Nisa.

Despacho nº 16/94 de 26 de Janeiro (1994) - Referente ao Queijo Terrincho.

Despacho nº 49/96 (II Série) . (17 de Junho de 1996). Define critérios uniformes para a concessão das derrogações a determinados estabelecimentos que fabricam produtos à base de leite .

DGADR. (2016). Queijos da Beira Baixa - DOP, Caderno de especificações. Obtido em Março de 2017, de Produtos Tradicionais Portugueses: <https://tradicional.dgadr.pt>

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 Environmental Microbiology* , 69 (1), 130-138.

Domingues, Liliana Isabel Pires (2015). Qualidade microbiológica e físico-química da água usada na higienização em explorações de leite de pequenos ruminantes. Dissertação à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco - Escola Superior Agrária.

El-Fouly, M., Sharaf, A., Shahin, A., El-Bialy, H. A., & Omara, A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* , 8 (1), 36-48.

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., & Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* , 26 (2), 228-231.

Ferreira, E., Voss, M., Santos, H. P., De-Polli, H., Neves, M. C., & Rumjanek, N. G. (2009). Fluorescent *Pseudomonas* diversity in different soil management and crop rotation systems. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* , 4 (2), 140-148.

Filipe, Mafalda Patrício Solipa (2012). Presença de *Listeria monocytogenes* e contagem de *Pseudomonas* em superfícies de uma indústria de laticínios. Relatório de estágio de Engenharia Biológica e Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco - Escola Superior Agrária.

Flemming, H.-C., Schaule, G., Griebe, T., Schmitt, J., & Tamachkiarowa, A. (1997). Biofouling - the Achilles heel of membrane processes. *Desalination* , 113, 215-225.

Francis, K. P., Mayr, R., Stetten, F. v., Stewart, G. S., & Scherer, S. (1998). Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Applied and Environmental Microbiology* , 64 (9), 3525-3529.

Franzetti, L., & Scarpellini, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology* , 57 (1), 39-47.

Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology* , 6 (214).

Gutiérrez, D., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodríguez, A., García, P., & Ruas-Madiedo, P. (2016). Monitoring in Real Time the Formation and Removal of Biofilms from Clinical Related Pathogens Using an Impedance-Based Technology. *Plos ONE* , 1-17.

Hettinga, K., Valenberg, H. v., & Hooijdonk, A. v. (2008). Quality control of raw cows' milk by headspace analysis. *International Dairy Journal* , 18, 506-513.

Hu, Z., Meng, X.-C., & Liu, F. (2016). Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk. *International Dairy Journal* , 55, 72-78.

International Standard ISO 11059 – Milk and milk products – Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp.. (2009).

International Standard ISO 18593– Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. (2004).

Jr., A. L., Agaras, B., Bettiol, M. P., Gatti, B. M., & Valverde, C. (2015). A cultivation-independent PCR-RFLP assay targeting oprF gene for detection and identification of *Pseudomonas* spp. in samples from fibrocystic pediatric patients. *Journal of Microbiological Methods* , 114, 66-74.

Kanner, J., & Rosenthal, I. (1992). An assessment of lipid oxidation in foods (Technical report). *Pure and Applied Chemistry* , 64 (12), 1959-1964.

Kasnowski, M. C., Mantilla, S. P., Oliveira, L. A., & Franco, R. M. (2010). Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* , 15.

Kim, M. J., Bancroft, E., Lehnkering, E., Donlan, R. M., & Mascola, L. (2008). *Alcaligenes xylooxidans* bloodstream infections in outpatient oncology office. *Emerging Infectious Diseases* , 14 (7), 1046-1052.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Winn, W., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P. C., et al. (2006). *Diagnóstico microbiológico* (6ª Edição ed.). Lippincott & Wilkins.

Kumar, C. G., & Anand, S. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* , 42 (1-2), 9-27.

Laborclin. (2011). *Manual para antibiograma - Difusão em disco*.

Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology* , 70 (9), 5644-5650.

Lambert, P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine* , 95 (41), 22-26.

Law, B. A. (1979). Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research* , 46, 573-588.

Lemsaddek, A. (2008). Estudos de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. *Doutoramento em Biologia (Microbiologia)*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências Departamento de Biologia Vegetal.

Lerliche, F., & Fayolle, K. (2012). No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. *Journal of Dairy Science* , 95 (5), 2299-2306.

Lima, L. M. (Setembro de 2008). *Conceitos básicos de técnicas em Biologia Molecular*. Campina Grande: Embrapa.

Machado, S. G., Bazzolli, D. M., & Vanetti, M. C. (2013). Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. *International Dairy Journal*, 29 (1), 8-14.

Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., et al. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 268-281.

Marchand, S., Coudijer, K., Heyndrickx, M., Dewettinck, K., & Block, J. D. (2008). Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. *International Dairy Journal*, 18 (5), 514-519.

Martin, N., Murphy, S., Wiedmann, M., & Boor, K. (2011). When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *Journal of Dairy Science*, 94, 3136-3183.

Martinez-Rios, V., Ostergaard, N. B., Gkogka, E., Rosshaug, P. S., & Dalgaard, P. (2016). Modelling and predicting growth of psychrotolerant pseudomonads in milk and cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 110-120.

Martins, A. P. (2006). O papel do cardo na tecnologia tradicional de fabrico de queijo - Efeitos dos principais factores. *Boletim informativo Queijo de Azeitão*, nº5.

Martins, M. L., Araújo, E. F., Mantovani, H. C., Moraes, C. A., & Vanetti, M. C. (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., Rocha, R. B., Araújo, E. F., & Vanetti, M. C. (2006). Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 111 (2), 144-148.

Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-Soud, W. A., Sorensen, S. J., & Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (1-2), 192-202.

Matos, F. M. (1996). A tecnologia de produção do queijo Serra da Estrela. As regras técnicas e higiénicas que devem ser observadas. *Terra fértil*, 1, 41-44.

Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M., & Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, 99 (12), 10128-10149.

Nagel, O., Molina, M. P., & Althaus, R. (2013). Microbiological system in microtitre plates for detection and classification of antibiotic residues in milk. *International Dairy Journal*, 32, 150-155.

Nielsen, S. S. (2002). Plasmin System and microbial proteases in milk: characteristic, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6628-6634.

Norma Portuguesa EN ISO 22000 - Sistemas de gestão da segurança alimentar. (2005). Instituto Português da Qualidade.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* , 54, 49-79.

Oliveira, D. T., Moreira, A., Urnau, L., Noskoski, L., & Cereser, N. D. (2012). Psicotróficos na indústria de laticínios. Obtido em Outubro de 2016, de Unicruz: <https://www.unicruz.edu.br/seminario/downloads/anais/ccs/psicrotrofos%20na%20industria%20de%20laticinios.pdf>

Oliveira, M. C., Regitano, L. C., Roese, A. D., Anthonisen, D. G., Patrocínio, E. d., Parma, M. M., et al. (2007). Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: Embrapa Pecuária Sdeste.

Pelt-Verkuil, E. v., Belkum, A. v., & Hays, J. P. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer.

Perry, K. S. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova* , 27 , 293-300.

Pintado, C., Ferreira, M., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control* , 21, 240-246.

Pinto, C. L., Machado, S. G., Martins, M. L., & Vanetti, M. C. (2015). Identification of proteolytic psychrotropic bacteria isolated from refrigerated raw mil and characterization of its spoilage potential. *Instituto de Laticínios Cândido Tostes* , 70(2), 105-116.

Pinto, C. L., Martins, M. L., & Vanetti, M. C. (2006). Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* , 26 (3), 645-651.

Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro. (1990). *Diário da República*.

Regulamento (CE) Nº 852 (2004) do parlamento Europeu e do Concelho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. (s.d.). Obtido em Outubro de 2016, de EUR-Lex: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:pt:PDF>

Regulamento (CE) Nº 853 (2004) do parlamento Europeu e do Concelho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Obtido em Outubro de 2016, de EUR - Lex: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:PT:PDF>

Sandrou, D. K., & Arvanitoyannis, I. S. (2000). Application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system to the cheese-making industry: a review. *Food Reviews International* , 16 (3), 327-368.

Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals* , 42, 1-7.

Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* , 20, 407-413.

Silva, P. D. (Dezembro de 2005). Avaliação, identificação e actividade enzimática de bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado. Dissertação apresentada ao

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte- Departamento de Engenharia Química.

Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 573-583.

Spinosa, H. d., Górnaiak, S. L., & Bernardi, M. M. (2011). *Farmacologia aplicada `Medicina Veterinária* (5ª Edição ed.). Guanabara Koogan.

Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *AJIC*, 34 (5), 3-10.

Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S., & GD, G. D. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (Sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2545-2553.

Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., & Boor, K. J. (2000). Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5), 2085-2095.

Wilson, K., & Walker, J. (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (7ª Edição ed.). Cambridge University Press.

Yoon, Y., Lee, S., & Choi, K.-H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201-215.

Anexos

Anexo I - Caracterização morfológica das colónias

Tabela 12 - Caracterização morfológica atribuída a cada tipo de colónia.

Tipo	Características
a	Colónia amarelo vivo, pequena/média, margem inteira, convexa e brilhante
a`	Colónia amarelo claro, pequena/média, margem inteira, convexa e brilhante
a``	Colónia amarela que parece ter margem ligeiramente ondulada
a````	Colónia média, amarela, convexa no centro e brilhante e com rebordo plano e baço e margem inteira
b	Colónia bege azulado, pequenas, margem inteira, convexa e brilhante
b`	Colónia bege azulado na zona periférica e bege opaco no centro de tamanho médio
c	Colónia bege opaco, margem inteira, convexa e brilhante
c`	Colónia bege muito claro, margem inteira, convexa, média/grande e muciliginosa
c``	Colónia idêntica ao tipo c mas com pigmentos amarelo acastanhado
d	Colónia bege, média/grande, margem ondulada, brilhante
d`	Colónia bege salmão ligeiramente brilhante, média ondulada
d``	Colónia bege salmão ligeiramente brilhante, pequena/média e margem inteira
e	Colónia bege ligeiramente mamilonada, margem ondulada, ligeiramente baça (tipo estrelado) de tamanho medio
e`	Colónia bege, média, ligeiramente baça, margem inteira e ligeiramente mamilonada
f	Colónia pequena/média, bege escuro/castanho claro, margem inteira, convexa
g	Colónia bege, ligeiro brilho, margem ondulada, umbilicada
g`	Colónia bege, ligeiro brilho, margem ondulada, mamilonada
g``	Colónia bege ligeiramente convexa e ligeiramente ondulada
h	Colónia média bege amarelado, margem inteira, baça e mamilonada
h`	Colónia média, bege claro, margem inteira, baça, mamilonada e em forma de anel
h``	Colónia bege amarelado, pequena/média, ligeiro brilho, margem inteira e mamilonada
i	Colónia pequena, bege, convexa e margem ligeiramente ondulada
j	Colónia pequena/média brilhante, margem inteira e ligeiramente umbilicada
k	Colónia grande com ligeiro brilho, bege claro, margem ondulada (em forma de flor) e ligeiramente frisada
k`	Colónia média, bege claro, baça, margem ondulada e ligeiramente frisada
l	Colónia grande ligeiramente baça, bege claro, margem ondulada e frisada e ligeiramente elevada no centro
l`	Colónia média ligeiramente baça, bege claro, margem ondulada, frisada, plana e ligeiramente mamilonada

Anexo II - Identificação dos isolados

Tabela 13 - Identificação, perfis numéricos dos isolados provenientes de zaragatoas a superfícies, água, leite e queijo com base na utilização do sistema de identificação API 20NE.

	Nº	Referência	Identificação (API 20 NE)
Queijo	27	Queijo Cabra Merendeira-060515 (casca Lavada) col. 2	0140457 (MBI, 48 h, 99,6%) <i>Pseudomonas putida</i>
	188	Queijo 10 ⁻⁵ col 1c - Zaragatoa queijo de cabra	0000004 (IA, 24 h e 48 h, 82,3%) <i>Moraxella</i> spp.
	189	Queijo 10 ⁻⁵ col 1d - Queijo de cabra	0146457 (BIGP, 48 h, 74,3%) <i>Pseudomonas putida</i>
	191	Queijo 10 ⁻⁴ col 1a'' - Zaragatoa queijo de cabra	0140455 (IA, 48 h, 84,8%) <i>Pseudomonas putida</i>
	254	Estágio Mafalda _ Queijo casca, SM col. 4	0140457 (MBI, 48 h, 99,6%) <i>Pseudomonas putida</i>
Leite	1	Leite de cabra- L6-111- col.1e- 10 ⁻¹ - 1 (de 09.06.2015)	0357555 (MBI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	2	Leite de ovelha- L9- 124- col 1d- 10 ⁻⁴ - 1 (de 09.06.2015)	0357555 (MBI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	3	Leite de ovelha- L10- 126- col.2d- 10 ⁻³ - 2 (de 09.06.2015)	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	5	Leite 5 - Produtor 19 de 24/6/1015 (10 ⁻² col. 3C)	0472747 (PI) perfil inaceitável com possibilidade <i>Burkholderia gladioli</i>
	6	Leite de ovelha- L7- 83- col 2c- 10 ⁻⁴	0672345 (PD, 48 h, 96,6%) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	7	Leite de vaca- L9 - col 1e - 10 ⁻³ - 7 (de 24.06.2015)	0000057 (MBI, 48 h, 99,6%) <i>Alcaligenes faecalis</i>
	41	Leite de cabra - P103 - col.3 - 10 ⁻² - 1 (de 23.03.2015)	0047577 (FD) <i>Burkholderia cepacia</i> (24 h: 94,1%; <i>Ps fluorescens</i> 5,9%; 48 h: <i>Ps fluorescens</i> 85,3%, FD)
	46	Leite de cabra - P114 - col.1 - 10 ⁻⁵ - 6 (de 23.03.2015)	0346555 (MBI, 48 h, 99,7%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	55	Leite de cabra- L5-P68- col 1d - 10 ⁻³	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	67	Leite de cabra- L6-111- col 1e - 10 ⁻²	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	82	Leite de ovelha- L11-130- col 2c - 10 ⁻⁴	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	89	Leite de ovelha- L1-Produtor 2- col 1d - 10 ⁻² - 68 (de 24.06.2015)	1354575 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	105	Leite de cabra- L1-85- col 1e - 10 ⁻³ - 86	0146457 (BIGP, 48 h, 74,3%) <i>Pseudomonas putida</i>
	Leite	182	Leite de ovelha Produtor 2 (P2) 10 ⁻³ col 1c (de 24.02.2016)
184		Leite de ovelha Produtor 2 (P2) 10 ⁻³ col 3c (de 24.02.2016)	0342455 (BI, 48 h, 98,2%) <i>Pseudomonas putida</i>
9		Z10 - Francela da sala de lavagem de 24/7/2015 (10 ⁻² col.1c)	0042647 (FD, 48 h) <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (55,1%) ou <i>Pseudomonas putida</i> (23,5%)
20		Zaragatoa grade laranja- Z1 - col 1a -SM - 28 (de 26.05.2015)	5267747 (PI) perfil inaceitável com possibilidade <i>Burkholderia gladioli</i>
Zaragatoas	21	Zaragatoa forma grande microperefurada- Z8 - col 1e -SM - 29 (de 26.05.2015)	5267747 (PI) perfil inaceitável com possibilidade <i>Burkholderia gladioli</i>
	26	Zaragatoa de Liras (Cuba nº 2) Z8- col 1c-SM -116	0047555 (MBI, 48 h, 99,7%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	85	Zaragatoa da Francela (sala Produção) Z1- col 2c-10 ⁻¹ - 60 (de 08.06.2015)	0001044 (BI, 48 h, 96,8%) <i>Methylobacterium mesophilicum</i>
	88	Zaragatoa manipulador, Z9- col 4c-SM	0140457 (MBI, 48 h, 99,6%) <i>Pseudomonas putida</i>
	128	Zaragatoa manipulador, Z3- col 2c-SM	0000004 (IA, 24 h, 82,3%) <i>Moraxella</i> spp. e 0000044 (IA, 48 h, 88,5%) <i>Brevundimonas diminuta</i> / <i>Oligella urethralis</i>
	132	Z2 10 ⁻² col 1a' - Francela da sala de lavagem de queijo	0052467 (BI, 48 h, 99,1%) <i>Achromobacter xylosoxidans</i>
	135	Z3 10 ⁻¹ col 1b' - Carrinho inox 1 da sala de lavagem de queijo	0146455 (EIGP, 48 h, 71,0%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	136	Z3 10 ⁻¹ col 2c - Carrinho inox 1 da sala de lavagem de queijo (de 24.02.2016)	0000004 (IA, 24 h e 48 h, 82,3%) <i>Moraxella</i> spp.

(Continua)

(Continuação da Tabela 13)

	Nº	Referência	Identificação (API 20 NE)
Zaragatoas	137	Z3 10 ⁻¹ col 1e - Carrinho inox 1 da sala de lavagem de queijo	0347455 (MBIGP, 48 h, 82,3%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	139	Z4 10 ⁻¹ col 1c' - Doseador de mãos da sala de lavagem	0000004 (IA, 24 h, 82,3%) <i>Moraxella</i> spp. e 0000044 (IA, 48 h, 88,5%) <i>Brevundimonas diminuta</i> / <i>Oligella urethralis</i>
	142	Z4 10 ⁻² col 1c - Doseador de mãos da sala de lavagem	0000004 (IA, 24 h e 48 h, 82,3%) <i>Moraxella</i> spp.
	148	Z5 10 ⁻² col 3 - Carrinho plástico da sala de lavagem queijo	1000057 (FD, 48 h) <i>Alcaligenes faecalis</i> 1 (71,1%) ou <i>Achromobacter denitrificans</i> (11,9%)
	153	Z7 10 ⁻¹ col 1j - Escova de lavar queijo (individual)	0147455 (EIGP, 48 h, 82,3%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	154	Z7-10 ⁻² -1k Escova de lavar o queijo	0146455 (EIGP, 48 h, 71,0%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	155	Z7 10 ⁻² col 1L - Escova de lavar queijo (individual)	0147455 (EIGP, 48 h, 82,3%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	160	Z9-10 ⁻² -1g' Forma queijo pequena (de 24.02.2016)	0146456 (BIGP, 48 h, 74,3%) <i>Pseudomonas putida</i>
	170	Z11 10 ⁻² col 1d - Interior tanque refrigeração leite N ^o 4	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	172	Z11 10 ⁻² col 1g - Interior tanque refrigeração leite N ^o 4	0146455 (BIG, 48 h, 71%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	173	Z11 10 ⁻² col 1g' - Interior tanque refrigeração leite N ^o 4	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	181	Z15 - Grade laranja 10 ⁻¹ col 1d''	0000004 (IA, 24 h e 48 h, 82,3%) <i>Moraxella</i> spp.
	192	Cinta 10 ⁻⁵ col a) 2	0140457 (MBI, 48 h, 99,6%) <i>Pseudomonas putida</i>
	193	Z14 10 ⁻² col 1a' - Estante Câmara N ^o 3	0047767 (BI, 24 h, 98,8%) <i>Burkholderia cepacia</i>
	255	Estágio Mafalda _ Pasteurizador, 10-2, col. 4	0140057 (MBI, 48 h, 99,5%) <i>Pseudomonas putida</i>
	256	Estágio Mafalda _ Bomba interna, SM col. 1	0140057 (MBI, 48 h, 99,5%) <i>Pseudomonas putida</i>
Água	196	P2, 2F, 100 ml	0356557 (BI, 48 h, 99,5%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	197	P2, 3F, 100 ml	0142455 (BI, 48 h, 98,2%) <i>Pseudomonas putida</i>
	200	P8, 1F, 100 ml	0156557 (BI, 48 h, 97,2%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	203	P9, 1F, 100ml	0156557 (BI, 48 h, 97,2%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	204	P9, 3F, 100ml	1156557 (FD, 24 h e 48 h, 87,7%) <i>Burkholderia pseudomallei</i> (espécie altamente patogénica)
	211	P9, 4VM, 10ml	1156557 (FD, 24 h e 48 h, 87,7%) <i>Burkholderia pseudomallei</i> (espécie altamente patogénica) (87,7%) ou <i>Pseudomonas fluorescens</i> (12,2%)
	214	P10, 3F, 100ml	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	217	P17, 4V, 100ml	0154575 (BI, 24 h, 99,4%) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	220	P20, 3VM	0254767 (PI, 48 h) Possibilidade <i>Burkholderia gladioli</i>
	225	P26, 1F, 10 ml	1046555 (BI, 24 h, 98,7%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	229	P45, 1F	0157555 (EI, 48 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	231	P45, 3F	1147545 (MBI, 24 h, 99,9%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	233	P62, 1VM	1047555 (MBI, 24 h, 99,1%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	234	P83, 1F, 100ml	0140453 (MBI, 48 h, 99,3%) <i>Pseudomonas putida</i>
	235	P83, 2F, 100ml	<i>Pseudomonas putida</i>
	236	P85, 1VM	1056555 (BI, 48 h, 95,5%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	237	P85, 2VM	1156555 (FD, 48 h) <i>Burkholderia pseudomallei</i> (espécie altamente patogénica) (86,3%) ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2,7%)
	239	P87, 1VM	0000045 (BI, 48 h, 92,0%) <i>Brevundimonas diminuta</i> / <i>Oligella urethralis</i>

(Continua)

(Continuação da Tabela 13)

	Nº	Referência	Identificação (API 20 NE)
Água	28	P97, 2F, 100ml	1046555 (BI, 48 h, 98,7%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	29	P103, 2F, 1ml	0142457 (MBI, 24 h, 99,7%) <i>Pseudomonas putida</i>
	30	P106, 2F, 1ml	0046555 (MBI, 24 h, 99,6%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	31	P114, 1F, 10ml	0001454 (FD, 48 h, 78,3%) <i>Comamonas testosteroni</i> / <i>P. alcaligenes</i>
	244	P114, 1VM, 100ml	1047767 (BI, 24 h, 97,5%) <i>Burkholderia cepacia</i>
	246	P114, 1V, 10ml	0047555 (MBI, 48 h, 99,7%) <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	247	P114, 2V, 10ml	1156557 (FD, 24 h, 87,7%) <i>Burkholderia pseudomallei</i> (espécie altamente patogénica) (87,7%) ou <i>Pseudomonas fluorescens</i> (12,2%)
	248	P119, 1F	0344457 (BI, 48 h, 96,7%) <i>Pseudomonas putida</i>
	249	P119, 2F	0144457 (BI, 48 h, 97,6%) <i>Pseudomonas putida</i>
	32	P119, 5F, 10ml	0000005 (FD, 48 h, 38,8%) <i>Brevundimonas diminuta</i> / <i>Oligella urethralis</i>

Anexo III - Dendrogramas: Parte 1

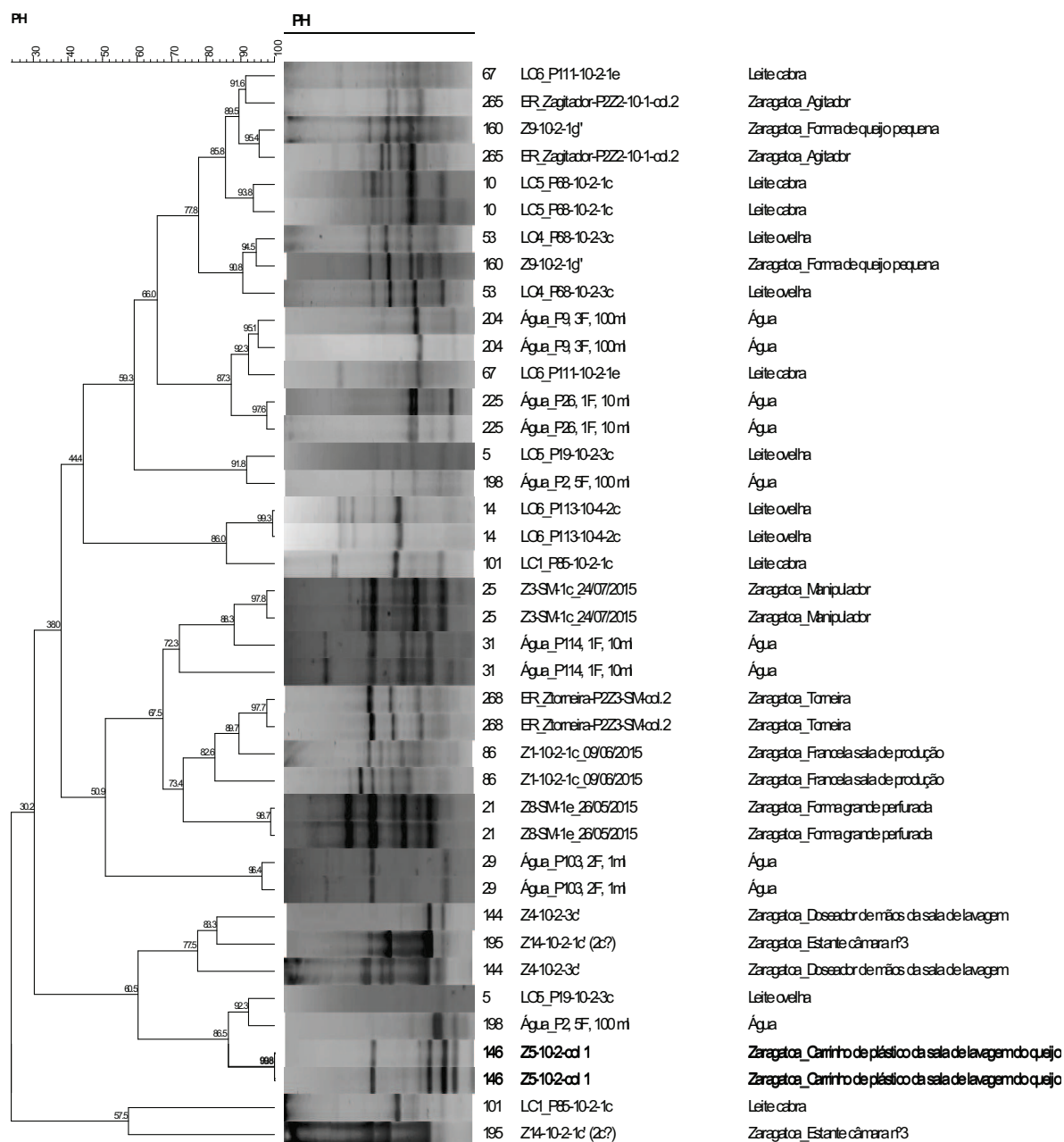


Figura 26 - Dendrograma das réplicas referentes ao *primer* PH, valores de similaridade para o cálculo da reprodutibilidade.

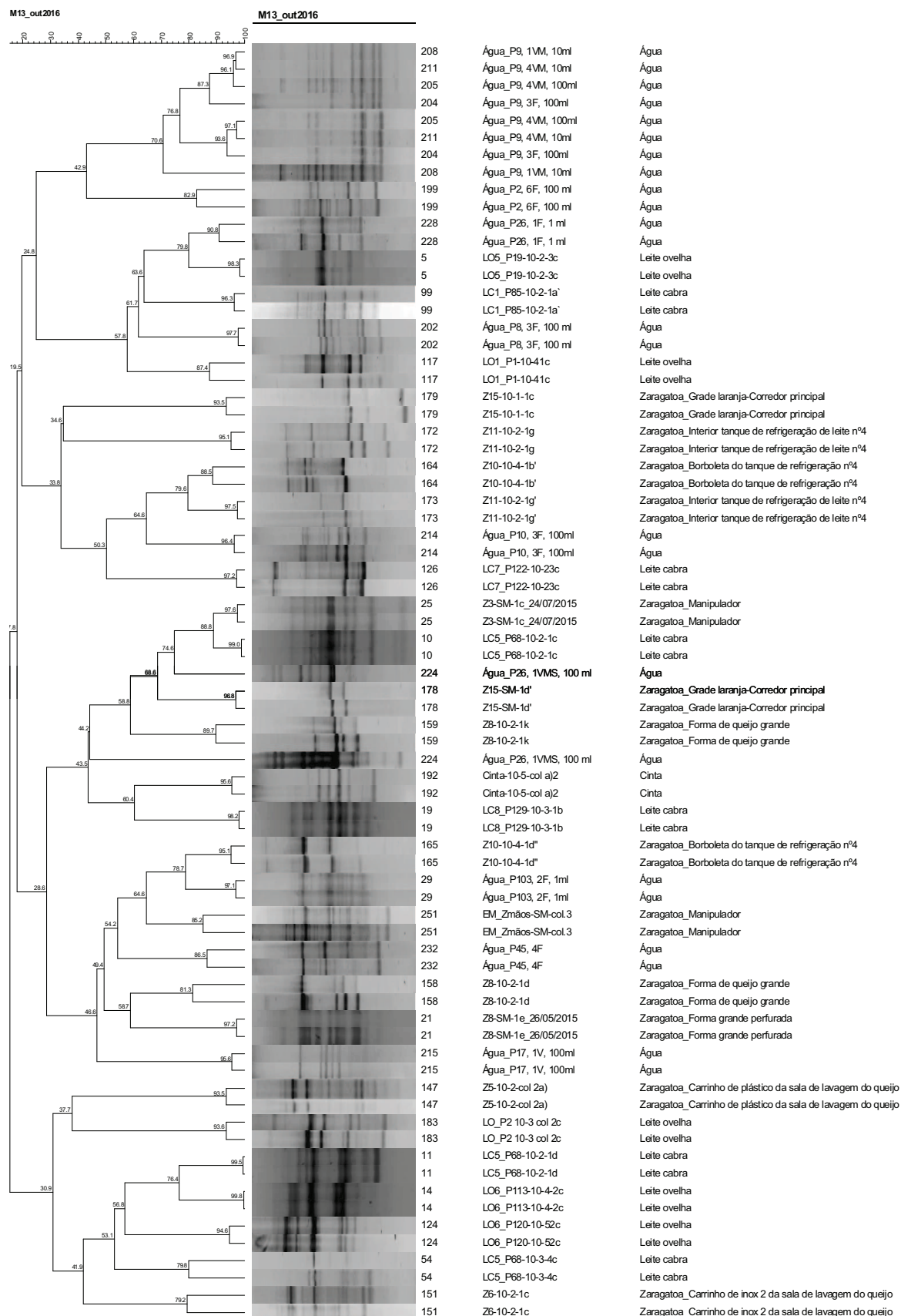


Figura 27 - Dendrograma das réplicas referentes ao primer csM13, valores de similaridade para o cálculo da reprodutibilidade.

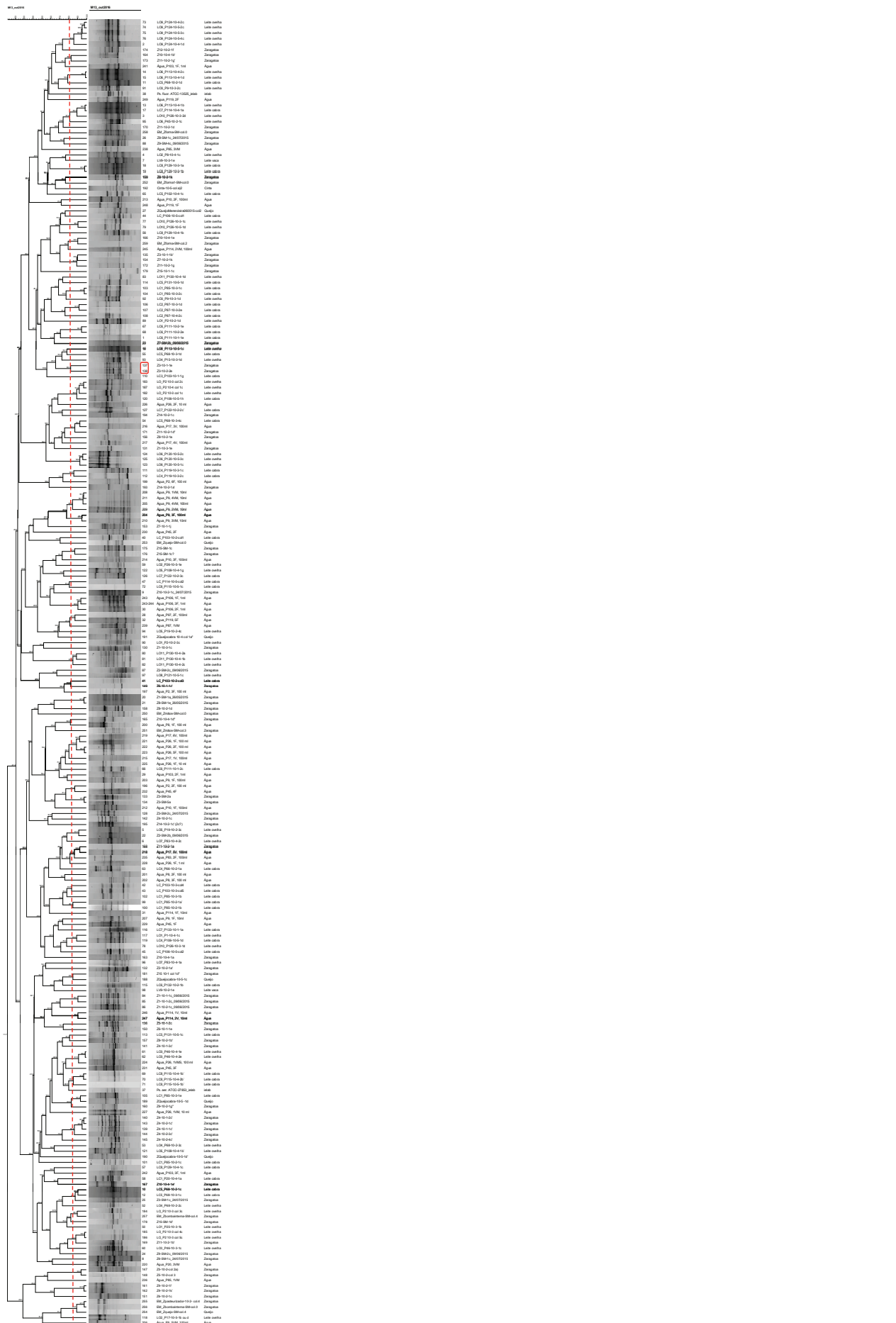


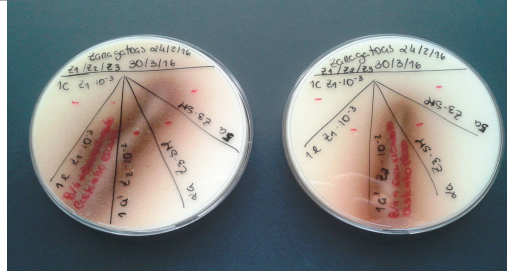
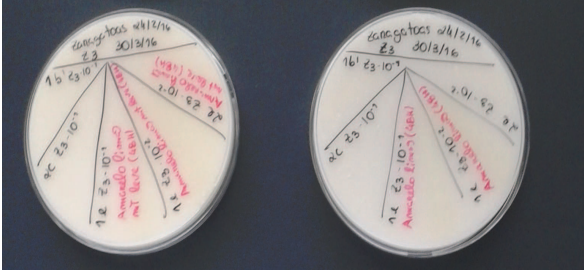

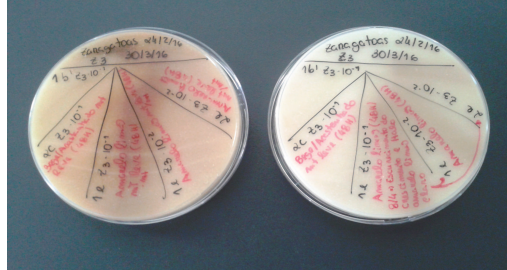
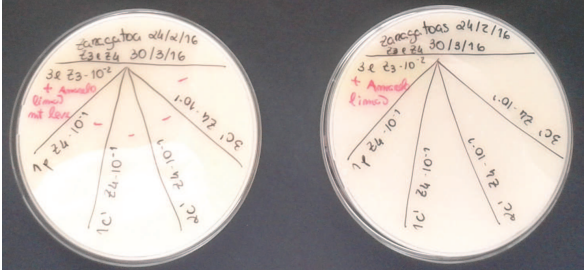
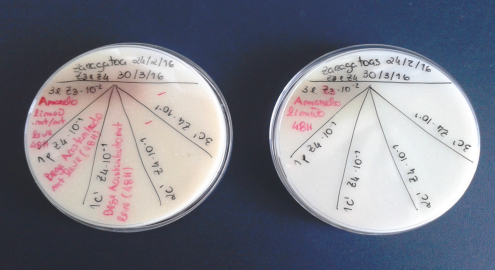



Figura 28 - Dendrograma de similaridade calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson com base nos perfis do *primer* csm13.

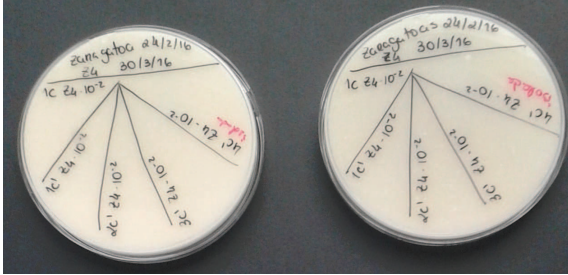
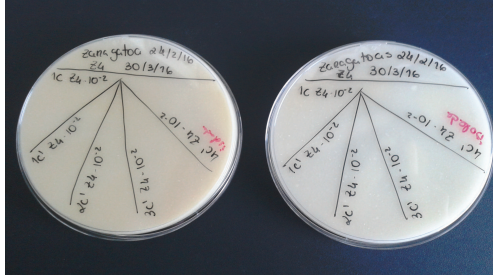
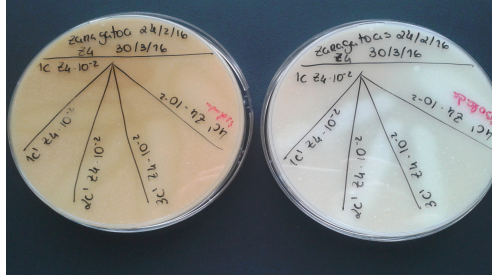
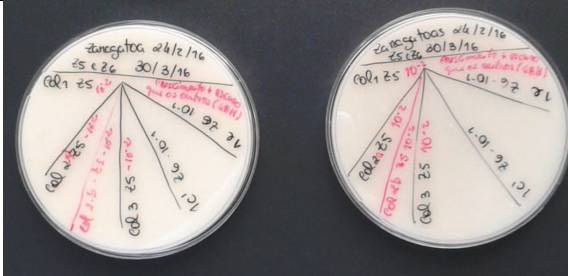

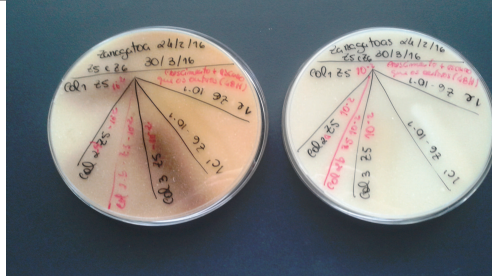
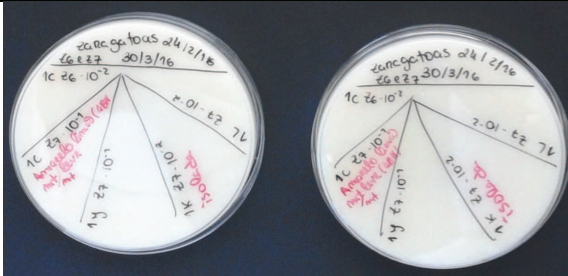

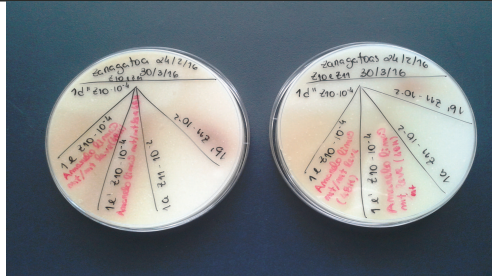
Anexo IV - Escurecimento dos isolados em Agar Queijo

Tabela 14 - Repicagem em Agar queijo com tirosina e sem tirosina, acompanhamento do escurecimento dos isolados às 48 h, 8 dias e 21 dias.

Refª dos isolados	48 h	8 dias	21 dias
130- Z1 10 ⁻³ 1c 131- Z1 10 ⁻³ 1e 132- Z2 10 ⁻² 1a' 133- Z3 SM 2a 134- Z3 SM 5a			
135- Z3 10 ⁻¹ 1b' 136- Z3 10 ⁻¹ 2c 137- Z3 10 ⁻¹ 1e Z3 10 ⁻² 1e 138- Z3 10 ⁻² 2e			
Z3 10 ⁻² 3e Z4 10 ⁻¹ 1p 139- Z4 10 ⁻¹ 1c' 140- Z4 10 ⁻¹ 2c' 141- Z4 10 ⁻¹ 3c'			

Continua

Continuação da Tabela 14

Refª dos isolados	48 h	8 dias	21 dias
142- Z4 10 ⁻² 1c 143- Z4 10 ⁻² 1c` Z4 10 ⁻² 2c` 144- Z4 10 ⁻² 3c` 145- Z4 10 ⁻² 4c`			
146- Z5 10 ⁻² col 1 147- Z5 10 ⁻² col 2a) Z5 10 ⁻² col 2b 148- Z5 10 ⁻² col 3 149- Z6 10 ⁻¹ 1c` 150- Z6 10 ⁻¹ 1e			
151- Z6 10 ⁻² 1c 152- Z7 10 ⁻¹ 1c 153- Z7 10 ⁻¹ 1j 154- Z7 10 ⁻² 1k 155- Z7 10 ⁻² 1l			

Continua

Continuação da Tabela 14

Refª dos isolados	48 h	8 dias	21 dias
156- Z8 10 ⁻² 1a 157- Z8 10 ⁻² 1b` 158- Z8 10 ⁻² 1d 159- Z8 10 ⁻² 1k 160- Z9 10 ⁻² 1g`			
Z9 10 ⁻² 1h` 162- Z9 10 ⁻² 1k` 161- Z9 10 ⁻² 1l` 163- Z10 10 ⁻⁴ 1a 164- Z10 10 ⁻⁴ 1b`			
165- Z10 10 ⁻⁴ 1d` 166- Z10 10 ⁻⁴ 1e 167- Z10 10 ⁻⁴ 1e` 168- Z11 10 ⁻² 1a 169- Z11 10 ⁻² 1b`			

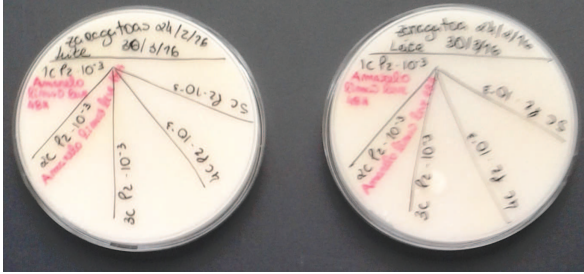
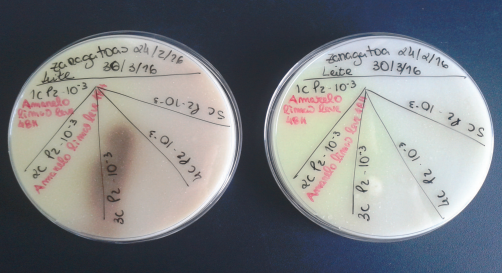
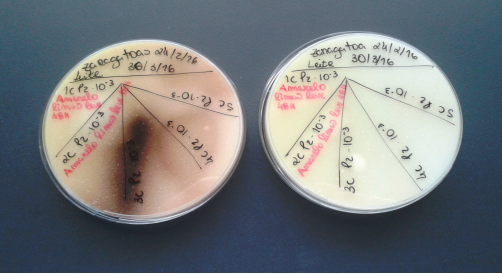
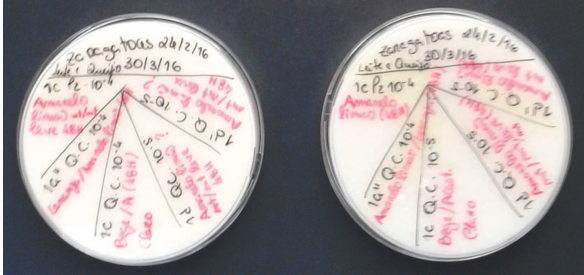
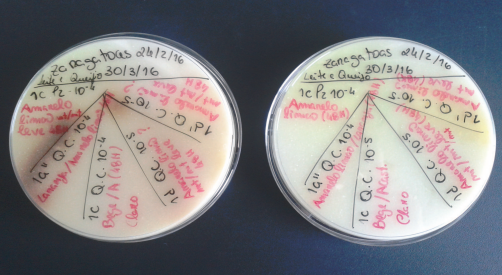
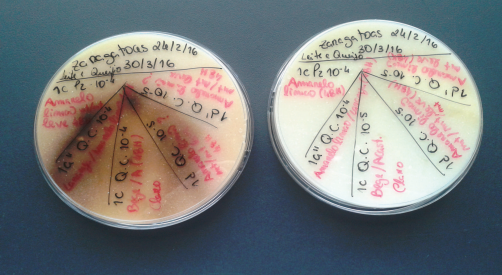
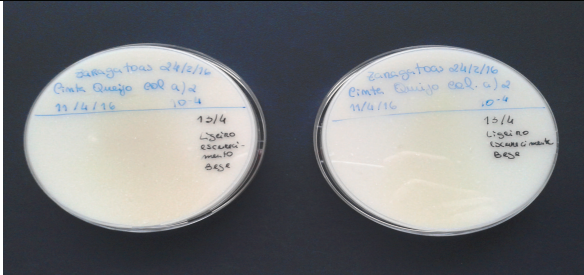
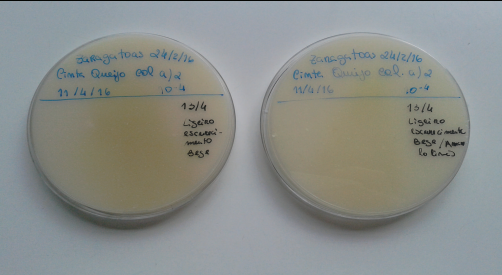

Continua

Continuação da Tabela 14

Ref ^a dos isolados	48 h	8 dias	21 dias
170- Z11 10 ⁻² 1d 171- Z11 10 ⁻² 1d` 172- Z11 10 ⁻² 1g 173- Z11 10 ⁻² 1g` 174- Z12 10 ⁻² 1f			
193- Z14 10 ⁻² 1a` 194- Z14 10 ⁻² 1c 195- Z14 10 ⁻² 1c` (2c?) 175- Z15 SM 1c 176- Z15 SM 1c?			
177- Z15 SM 1c` 178- Z15 SM 1d` 179- Z15 10 ⁻¹ 1c Z15 10 ⁻¹ 1d` 181- Z15 10 ⁻¹ 1d``			

Continua

Continuação da Tabela 14

Refª dos isolados	48 h	8 dias	21 dias
182- Leite 10 ⁻³ 1c 183- Leite 10 ⁻³ 2c 184- Leite 10 ⁻³ 3c 185- Leite 10 ⁻³ 4c 186- Leite 10 ⁻³ 5c			
187- Leite 10 ⁻⁴ 1c 191- Queijo 10 ⁻⁴ 1a Queijo 10 ⁻⁴ 1c 189- Queijo 10 ⁻⁵ 1d 190- Queijo 10 ⁻⁵ 1d			
192- Cinta 10 ⁻⁴ col. 2a)			

Anexo V - Dendrogramas: Parte 2

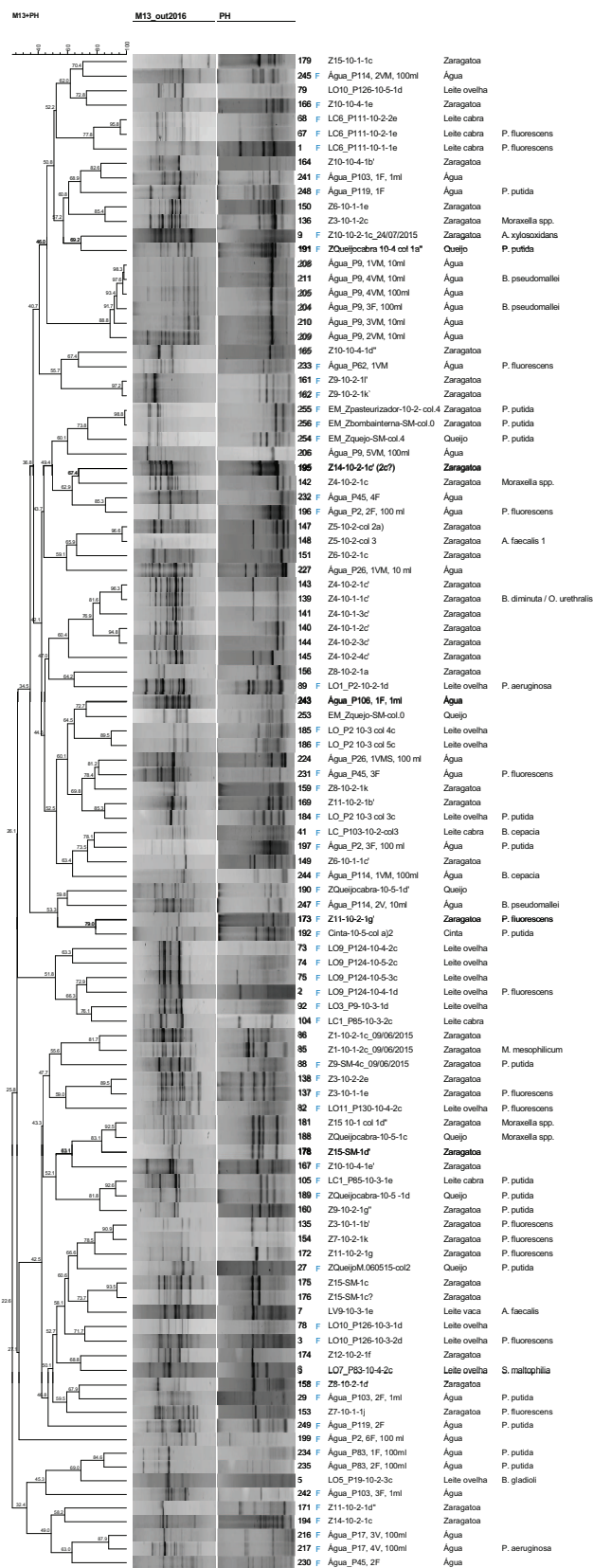


Figura 30 - Dendrograma de similaridade com isolados que continham capacidade de escurecimento no meio de cultura Agar queijo.

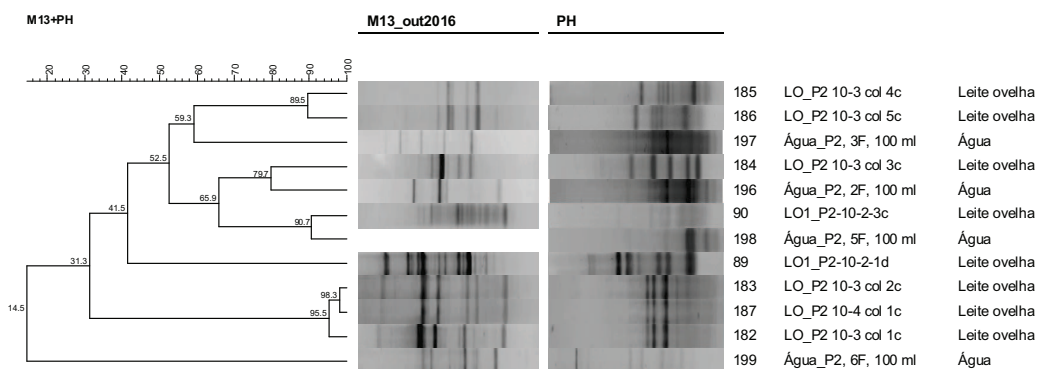


Figura 31 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 2.

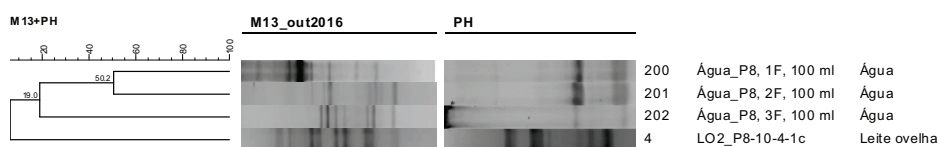


Figura 32 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 8.

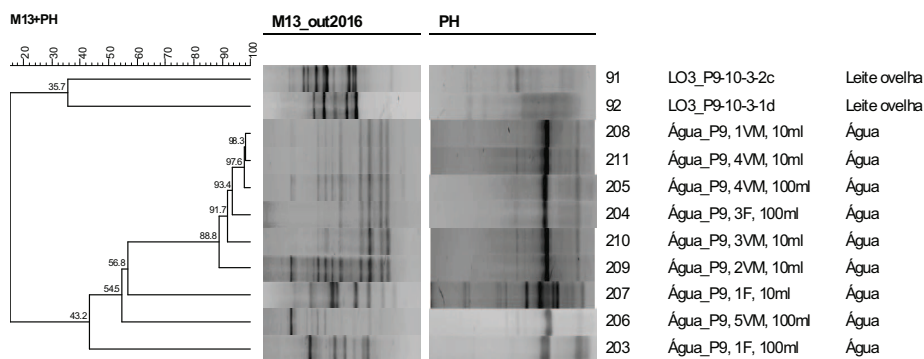


Figura 33 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 9.

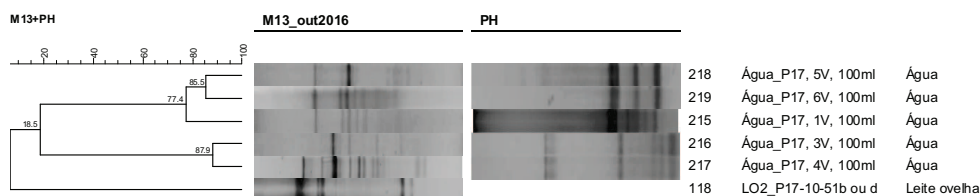


Figura 34 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 17.

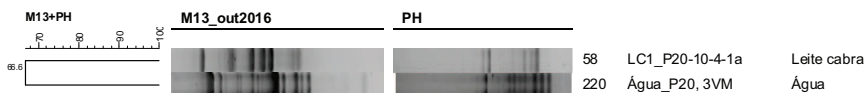


Figura 35 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 20.

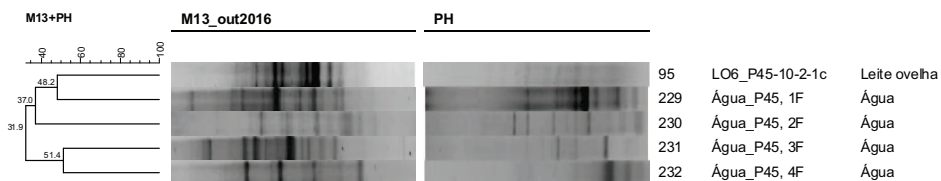


Figura 36 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 45.

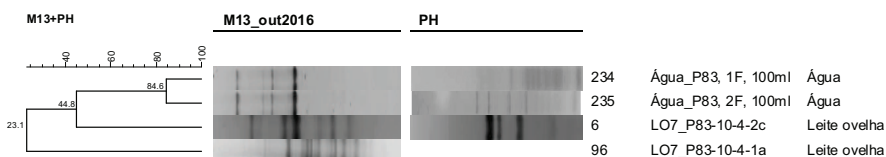


Figura 37 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 83.

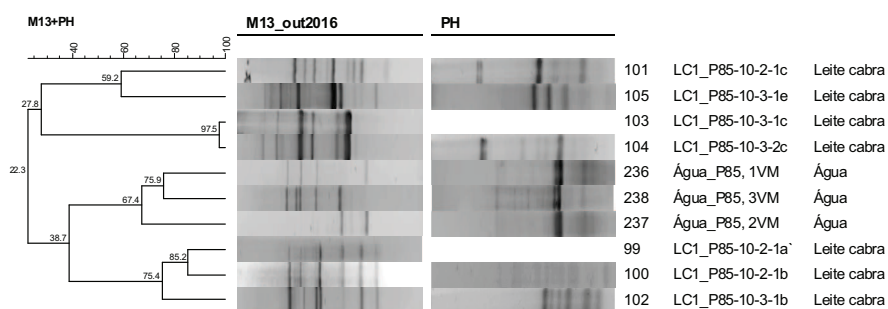


Figura 38 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 85.

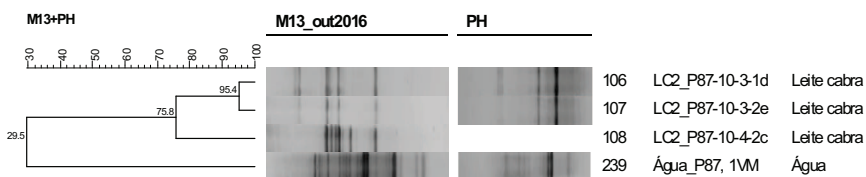


Figura 39 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 87.

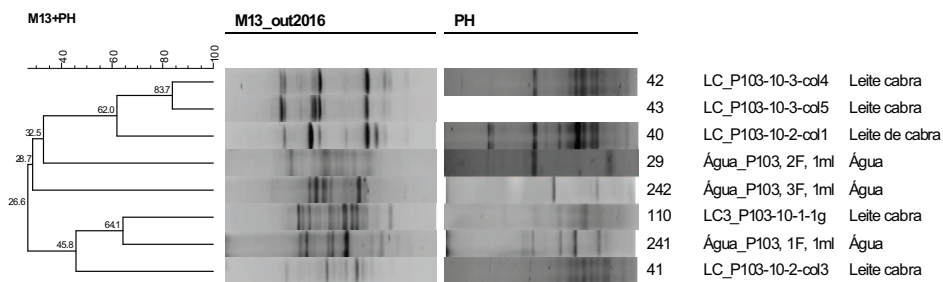


Figura 40 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 103.

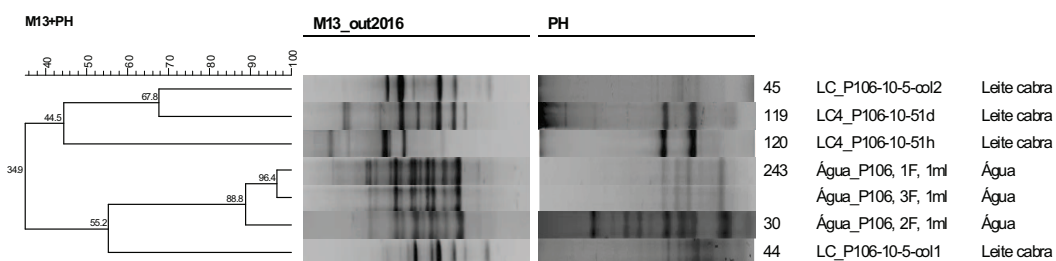


Figura 41 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 106.

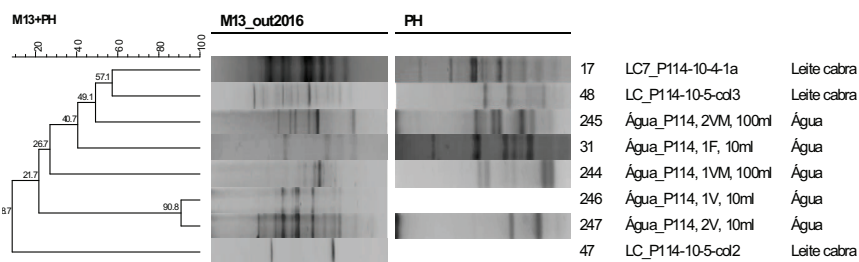


Figura 42 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 114.

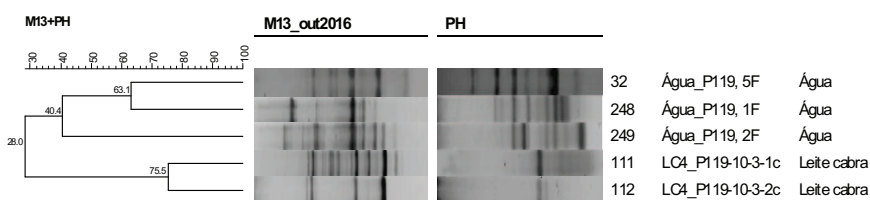


Figura 43 - Dendrograma se similaridade com isolados das amostras de água e leite do produtor 119.

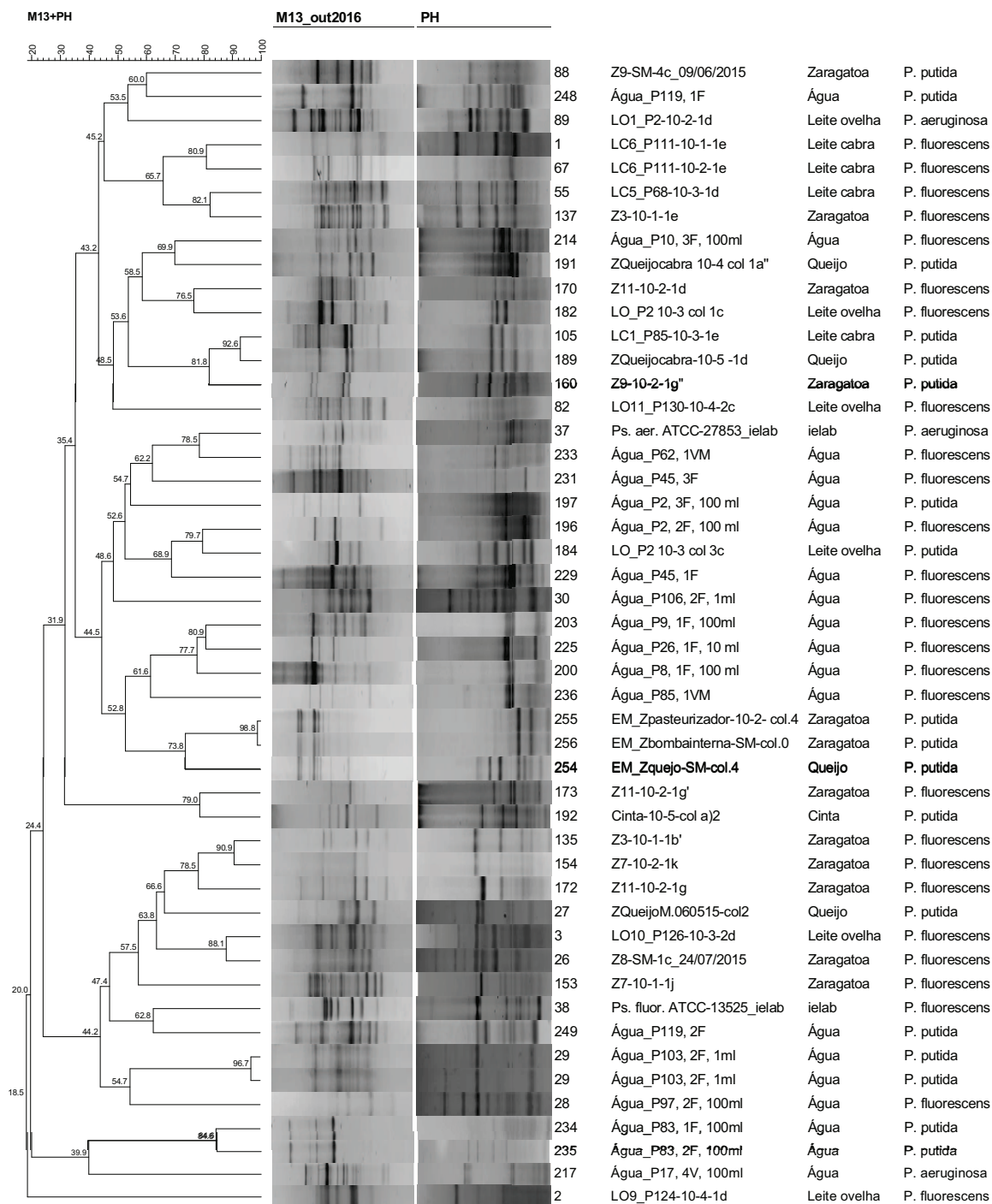


Figura 44 - Dendrograma se similaridade com isolados identificados do género *Pseudomonas* spp.