

PESQUISA DOS GENES LIP A E APRX EM LINHAGENS DE *Corynebacterium bovis*, E SEU CRESCIMENTO SOB REFRIGERAÇÃO.

Cassiano Victória¹
Rodrigo Costa da Silva²
Felipe Gazza Romão³
Helio Langoni⁴

RESUMO

Alguns micro-organismos comumente encontrados no leite cru de animais mastíticos possuem a capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, sendo denominados de psicrotróficos, e neste grupo, alguns têm ainda a capacidade de produzir enzimas termoestáveis, que degradam proteínas e lipídeos, promovendo alterações importantes no leite armazenado por longos períodos de tempo. O presente estudo objetivou determinar se *Corynebacterium bovis* possui a capacidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração e se possui os genes aprX e lipA, produtores de enzimas que degradam proteínas e gorduras do leite armazenado por longos períodos de tempo. O agente foi incubado a 0,7 e 4°C, por 10 dias consecutivos, com a aferição dos valores de absorvância (A) em espectrofotômetro a cada 24 horas (momentos M0 à M9). Para a verificação da presença dos genes foi realizada a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os resultados revelaram que *C. bovis* é capaz de se multiplicar sob refrigeração após 120 horas de incubação onde houve diferença significativa com $P < 0,05$ entre os períodos M5(A=0,264) e M6(A=0,297) considerado-o como psicrotrófico. Por outro lado, não possui os genes aprX e lipA, não produzindo as enzimas codificadas por estes genes, o que não significa que o *C. bovis* não possua genes para a produção de outras enzimas degradantes, não pesquisadas no presente estudo. Isto sugere que novos estudos do genoma deste micro-organismo são necessários, para se elucidar o verdadeiro papel deste agente na alteração da qualidade do leite e de seus subprodutos.

Palavras-chave: *Corynebacterium bovis*, mastites, aprX, lipA, crescimento.

RESEARCH FOR LIP A AND APRX GENES IN *Corynebacterium bovis* SAMPLES, AND ITS GROWTH UNDER REFRIGERATION.

ABSTRACT

Some microorganisms frequently found in the raw milk of mastitics animals have the ability of multiplying in low temperatures, being called of psychotropic, and in this group, some have still the capacity to produce term steady enzymes that degrade proteins and fats, promoting relevant alterations in long periods stored milk. The present study aimed to determine if *Corynebacterium bovis* has the capacity to multiply in low temperature and if it had aprX and lipA genes, producing enzymes that degrade proteins and fats of the milk stored by long periods of time. The agent was incubated by 10 consecutive days in refrigeration,

¹ Professor Assistente Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu – SP, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. email:cassiano@fmvz.unesp.br.

² Pós-doutorando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

³ Núcleo de Pesquisa em Mastites – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP.

⁴ Professor Titular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu – SP, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

varying between 0.7 to 4°C, and daily reading of absorbance (A) in spectrophotometer each 24 hours (M0 to M9 moments). The gene presence was accomplished with polimerase chain reaction (PCR). The results revealed that *C. bovis* is capable to multiply under refrigeration after 120 hours of incubation as observed between the moments M5 ($A=0.264$) and M6 ($A=0.297$) where $P<0.05$ confirming as psychotropic agent. In the other hand the studied microorganism doesn't possess the lipA and aprX genes, therefore it is not capable to produce the enzymes codified by these genes, what doesn't mean that *C. bovis* doesn't possess genes for the production of other degrading enzymes, don't researched in the present study. This suggests that new studies of the genome of this microorganism are necessary, to elucidate this agent's true paper in the alteration of the quality of the milk and of their products.

Keywords: *Corynebacterium bovis*, mastitis, aprX, lipA, growth.

PRESENCIA DE LOS GENES LIPA Y APRX EN MUESTRAS DE *Corynebacterium bovis*, Y SU DESARROLLO EN REFRIGERACIÓN.

RESUMEN

Algunos microorganismos comúnmente encontrados en la leche cruda de animales mastíticos tienen la capacidad de multiplicarse en temperaturas de refrigeración, siendo llamados psicotróficos, y en este grupo, algunos aún tienen la capacidad de producir enzimas termoestables, que degradan proteínas y lípidos, promoviendo importantes alteraciones en la leche almacenada por largos períodos de tiempo. El presente estudio objetivó determinar si *Corynebacterium bovis* tiene la capacidad de multiplicarse en temperatura de refrigeración y si tiene los genes aprX y lipA, productores de enzimas que degradan proteínas y gorduras de la leche almacenada por largos períodos de tiempo. El agente fue incubado en 0,7 y 4°C, por 10 días consecutivos, con la aferición de los valores de absorbancia (A) en espectrofotómetro por cada 24 horas (momentos M0 hasta M9). Para la verificación de la presencia de los genes fue realizada la reacción en cadena por la polimerasa (PCR). Los resultados revelaron que *C. bovis* puede multiplicarse en refrigeración después de 120 horas de incubación donde hubo diferencia significativa con $P<0,05$ entre los períodos M5 ($A=0,264$) y M6 ($A=0,297$) considerado psicotrófico. Por otro lado, no tiene los genes aprX y lipA, no produciendo las enzimas codificadas por estos genes, lo que no significa que *C. bovis* no tiene genes para la producción de otras enzimas degradantes, no pesquisadas en el presente estudio. Eso sugiere que nuevos estudios del genoma de este microorganismo son necesarios para elucidar el verdadero papel de este agente en la alteración de la calidad de la leche y de sus subproductos.

Palabras-chave: *Corynebacterium bovis*, mastitis, aprX, lipA.

INTRODUÇÃO

A mastite caracteriza-se como uma reação inflamatória da glândula mamária, responsável por alterações físicas e químicas do leite, pelo aumento na concentração de células somáticas, e por alterações patológicas na própria glândula mamária (1). Há que se considerar ainda os aspectos de saúde pública, pois o leite pode ser veículo de microorganismos potencialmente patogênicos ao homem, seja pelo seu consumo direto “in natura”, seja pela ingestão de certos tipos de alimentos produzidos a partir do leite contaminado (2).

Patógenos considerados de menor relevância, como por exemplo, o *Corynebacterium bovis*, desempenham um papel pouco conhecido, porém não menos importante neste processo, conforme demonstraram Yurukov & Todorov (3), que o isolaram em 73% das

infecções subclínicas estudadas e Counter (4), com 87% de isolamento nos casos clínicos pesquisados.

Alguns autores classificam ainda os micro-organismos do gênero *Corynebacterium* spp. como psicrotróficos, e Dommett (5) cita que os micro-organismos mais isolados após a pasteurização à temperatura de 72°C ou 80°C por 15 segundos, são os corineformes. O mesmo autor cita ainda que quanto maior a temperatura de pasteurização, maior a prevalência deste gênero, porém especificamente em relação ao *C. bovis*, não há informações na literatura sobre a sua capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração, nem se apresentam genes específicos que codificam proteínas com características lipolíticas e proteolíticas.

Victoria et al. (6) isolaram *C. bovis* em cultura pura em 29,45% das 125 glândulas mamárias estudadas, superando inclusive, o percentual de isolamento dos gêneros *Staphylococcus* spp. (18,64%) e de *Streptococcus* spp. (15,44%), e encontraram ainda alterações físico-químicas no leite de vacas com mastite por este agente, reforçando sua importância nas infecções intramamárias.

Vários autores citam ainda como micro-organismos termodúricos mais frequentes, os gêneros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Mycobacterium* spp., *Streptococcus* spp., e *Clostridium* spp. (7, 5, 8, 9), e que micro-organismos do gênero *Corynebacterium* spp. apresentam além desta, outra característica importante, que é a capacidade de multiplicação sob temperatura de refrigeração, sendo considerados então como psicrotróficos.

Para Barbano et al. (10), a alta concentração de bactérias psicrotróficas no leite cru é necessária para que haja uma quantidade suficiente de proteases e lipases que causem a quebra das proteínas e gorduras após a pasteurização. Por outro lado, Ma et al. (11) e Chen et al. (12) afirmaram que o tempo de prateleira do leite e dos produtos lácteos é comprometido por alterações físico-químicas e organolépticas produzidas por lipases e proteases termoestáveis produzidas por estes micro-organismos.

As lipases e proteases mesmo em baixas concentrações são capazes de degradar gordura e proteína causando respectivamente sabor de ranço e sabor amargo no leite e produtos lácteos estocados sob refrigeração (13).

Dieckelmann et al. (14) estudando a diversidade de lipases em linhagens de *Pseudomonas* spp. citaram a presença do gene lipA em *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *Burkholderia* spp. Duong et al. (15) também registraram a presença do gene aprX em micro-organismos psicrotróficos, especialmente em *P. aeruginosa*.

Não há na literatura citações sobre o papel do *C. bovis* como micro-organismo psicrotrófico, bem como, se este agente apresenta os genes que codificam as proteínas com a capacidade de degradar lipídios e proteínas. Porém, existe uma possibilidade de que o agente em questão apresente estes genes em seu DNA, uma vez que o seu genoma não está completamente seqüenciado, segundo levantamentos realizados no Genbank.

Levando-se em consideração o exposto, propôs-se estudar este micro-organismo, objetivando especialmente verificar sua habilidade de crescimento em temperatura de refrigeração, bem como a presença ou ausência dos genes lipA e aprX no seu genoma.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento proposto foi realizado em duas etapas distintas. A primeira consistiu no isolamento das linhagens e na verificação do crescimento de *C. bovis* sob temperatura de refrigeração. Foram colhidas amostras de leite de vacas com mastite subclínica, de propriedades leiteiras do interior do estado de São Paulo, até totalizar 100 linhagens de *C. bovis* em estado puro. As amostras foram obtidas após a realização do Califórnia Mastitis Test (CMT), segundo Schalm e Noorlander (16), para a detecção das glândulas mamárias com

inflamação. Colheu-se ao redor de 10mL de leite em tubos de ensaio esterilizados, que foram identificados, mantidos em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, e encaminhados ao laboratório para o processamento.

Semeou-se ao redor de 0,03mL de leite de cada amostra, em placas de Petri contendo agar sangue ovino a 8%, e em placas com agar MacConkey. Em seguida incubou-se em estufa a 37°C, em condições de aerobiose, e a leitura foi realizada com 24, 48, 72 e 96 horas para a observação do crescimento do agente, ou de outros micro-organismos causadores de mastites. No caso de suspeita de isolamento de *Corynebacterium* spp procedeu-se o estudo morfológico pela coloração de Gram e repique do agente em meio de caldo cérebro coração enriquecido com 1% de Tween 80, com a incubação dos tubos por 24 a 48 horas para o re-isolamento do agente para sua caracterização bioquímica de acordo com Quinn et al. (17), com a realização das seguintes provas: verificação de hemólise, hidrólise da esculina, redução de nitrato, digestão da caseína, urease, glicose, maltose e sacarose.

Três amostras foram perdidas durante o processamento, totalizando 97 linhagens estudadas.

Para a verificação do crescimento de *C. bovis* sob temperatura de refrigeração, colônias de cada cepa recém isolada foram ressuspendidas em tubos de ensaio contendo 5mL de meio de caldo cérebro coração (BHI) e 1% de Tween 80 (18), até a obtenção da concentração bacteriana correspondente à escala 1 de McFarland (3×10^8 células bacterianas por mL).

Como controle negativo, utilizou-se uma solução pura de BHI com 1% de Tween 80, e como controle positivo, uma suspensão bacteriana de *P. aeruginosa* ATCC – 10145 também na concentração 1 da escala de McFarland.

Foram preparadas quatro placas de ELISA estéreis com noventa e seis poços, fundo chato e tampa, identificadas como placas 1, 2, 3 e 4 para cada momento (M0 a M9) totalizando 40 placas. As placas de número 1 continham os controles negativo e positivo, bem como as amostras de 1 a 30, distribuídas da seguinte maneira: os orifícios A1, A2 e A3 receberam 100µL da suspensão do controle positivo; os orifícios A4, A5 e A6, 100µL da suspensão do controle negativo, os demais orifícios foram preenchidos com 100µL de cada amostra, sempre em triplicata a exemplo dos controles. As placas de número 2, 3 e 4, receberam as amostras de 31 a 62, 63 a 95 e 96 a 97 respectivamente, distribuídas como descrito acima.

Após a distribuição das amostras nas placas procedeu-se a leitura do primeiro conjunto de placas 1, 2, 3 e 4, em espectrofotômetro Multiskan EX¹ com filtro de 405nm, correspondendo ao momento zero (M0). Os demais conjuntos de placas correspondentes os momentos M1 a M9 foram incubados em condições de aerobiose em temperaturas que variaram entre 0,7 e 4°C, em refrigerador comum destinado a essa finalidade. A cada 24 horas e durante nove dias consecutivos foram realizadas leituras referentes a cada momento, após homogeneização cuidadosa das placas e remoção das gotículas de água formadas por condensação em virtude da diferença de temperatura entre as placas e o meio ambiente, remoção esta que foi feita com o auxílio de um bico de Bunsen.

A segunda fase do experimento consistiu na verificação da presença ou ausência dos genes *lipA* e *aprX* responsáveis pela produção de lipases e proteases bacterianas, respectivamente.

Para cada cepa isolada, bem como para os controles positivos e negativos, foi realizada a extração de DNA segundo Nunes et al. (19). Transferiu-se 1mL da suspensão bacteriana na concentração 1 da escala de MacFarland, para microtubos de 1,5mL. Centrifugou-se por quatro minutos a 2500 x g, e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado três vezes com 1mL da solução tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8). A seguir, as

¹ Labsystems

Victória C. et al. Pesquisa dos genes *lipA* e *aprX* em amostras de *Corynebacterium bovis*, e seu crescimento sob refrigeração. Vet. e Zootec. 2011 set.; 18(3): 408-416.

células bacterianas foram ressuspensas em 100µL de tampão TE, aquecidas a 100°C por 10 minutos em termobloco, resfriadas a 4°C e centrifugadas a 9000 x g por 30 segundos.

Após o término da extração, 60µL de cada amostra foram analisados em espectrofotômetro GeneQuant Pro¹ para a quantificação do DNA extraído. Todas as amostras foram padronizadas para conter entre 85 e 95µg/mL de DNA, incluindo os controles positivos.

O sobrenadante resultante do processo de extração foi transferido para microtubos e congelado a -20°C para posterior análise pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Como controles positivos para a presença dos genes lipA e aprX, foram utilizadas, respectivamente, linhagens de *C. glutamicum* ATCC – 13032, e *B. liqueniformis* ATCC – 14580 obtidas do Catálogo de Culturas Tropical, da Fundação André Tosello.

Para a pesquisa do gene lipA no DNA de *C. bovis* foram utilizadas as seguintes seqüências de oligonucleotídeos: lipA sense 5'-TGTCGCTGAGTCTGTTCGTGAG-3', lipA anti-sense 5'-GATGATGTACAGCCAGCGTC-3' desenhados a partir do DNA do *C. glutamicum* com o número de acesso BX927154 e para a pesquisa do gene aprX, as seqüências: aprX sense 5'-GTGCACGAAGCGCTGACAATC-3' e aprX anti-sense 5'-TTGCTCGGTGAAGGAGACGTTG-3', desenhados a partir do DNA do *B. liqueniformis* com o número de acesso NC_006322 utilizando os softwares Gene Runner 3.0, AnnHyb 4.920 e MEGA 3.1.

Para a reação em cadeia pela polimerase para a pesquisa do gene lipA, cada microtubo de reação de 0,2mL recebeu 5µL de tampão de PCR (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 1,5µL de MgCl₂ (1,5mM), 8,0µL da solução de deoxinucleotídeos (1,25mM), 1,5U de Taq-polimerase platinum, 10pM de cada iniciador descrito anteriormente, 10µL de amostra e 15,2µL de água ultra-pura. A seguir os microtubos foram submetidos à denaturação inicial a 92°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de reação consistindo de denaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, sendo a reação finalizada com extensão a 72°C por 3 minutos (19).

Para a pesquisa do gene aprX foi utilizado o mesmo protocolo descrito para o gene lipA, porém com a substituição pelos iniciadores descritos acima.

Para a eletroforese em gel de agarose para identificação dos produtos amplificados, alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA 0,5x. A corrida foi realizada a 100 voltz por 90 minutos. Após a corrida o gel foi corado em solução de brometo de etídeo por uma hora, e a visualização das bandas realizada em transluminador ultravioleta, com filtro de 300nm. Os géis foram fotografados utilizando-se sistema fotográfico Polaroid.

Para a análise estatística dos dados referentes à verificação da temperatura de crescimento do agente, foram utilizados os valores de média para cada amostra analisada. Inicialmente foi realizada uma análise de variância seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-kramer, com nível de significância (α) de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto ao crescimento de *C. bovis* em temperatura de refrigeração, a tabela 1 expressa os valores de temperaturas aferidos no interior do refrigerador, no momento de cada leitura.

¹ Biochrom

Victória C. et al. Pesquisa dos genes lipA e aprX em amostras de *Corynebacterium bovis*, e seu crescimento sob refrigeração. Vet. e Zootec. 2011 set.; 18(3): 408-416.

Tabela 1. Aferição da temperatura interna do refrigerador nos momentos M0 a M9 do experimento, para verificação da curva de crescimento de *C. bovis*. Botucatu, SP.

MOMENTOS	TEMPERATURA (°C)
M0	TEMPERATURA AMBIENTE
M1	2,0°C
M2	1,8°C
M3	3,1°C
M4	0,7°C
M5	4,0°C
M6	2,2°C
M7	2,8°C
M8	3,2°C
M9	2,5°C

A figura 1 revela os resultados relativos aos valores de absorvância podendo-se observar uma tendência para a concentração bacteriana nos diferentes momentos analisados. Os resultados mostram que até o momento 5 (M5), houve uma pequena tendência de desenvolvimento de *C. bovis*, porém sem significado estatístico, com $P > 0,05$. Já a partir do momento M5 até M8, houve um crescimento estatisticamente significativo, com $P < 0,05$. O crescimento pouco significativo das amostras nos primeiros momentos do experimento pode estar relacionado com a adaptação do agente à temperatura de incubação utilizada, ou ainda pelo “estresse” promovido às células bacterianas devido à alteração brusca de temperatura a que foram submetidas as linhagens entre os momentos M0 e M1.

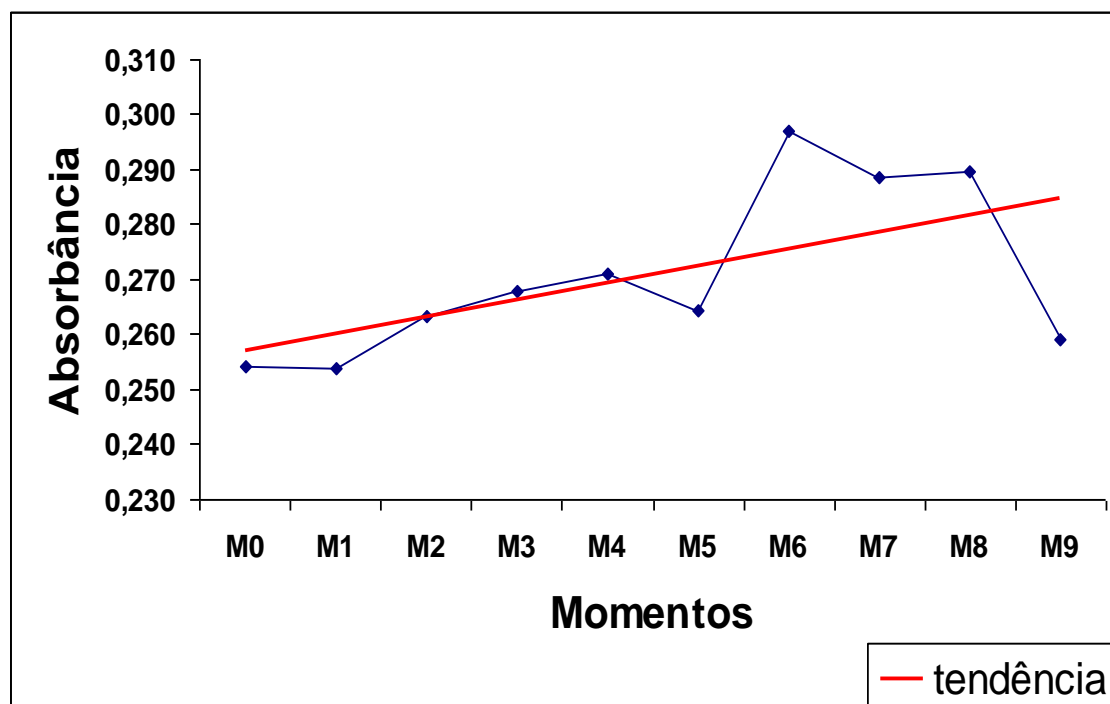


Figura 1. Médias dos valores de absorvância das noventa e sete linhagens de *C. bovis* estudadas, nos momentos M0 a M9. Botucatu, SP.

Após a fase de adaptação, houve uma multiplicação significativa do agente o que pode confirmar a hipótese de que o *C. bovis* se multiplica em temperatura de refrigeração, e que

longos períodos de armazenagem a baixas temperaturas antes de seu processamento na indústria, pode favorecer a sua multiplicação (12).

Entre os momentos M6 e M9 houve uma redução estatisticamente significativa nos valores médios de absorvância nas amostras. Este fato pode estar relacionado com a ruptura das células bacterianas após intensa multiplicação dos micro-organismos em que os produtos do metabolismo bacteriano atingiram um nível de toxicidade capaz de promover a morte destas bactérias, ou ainda com a redução de volume da solução final em virtude da evaporação provocada pela longa fase de incubação das amostras.

Os dados obtidos no presente experimento são contrários aos de Bramley e Mckinnon (20) que afirmaram não haver evidências de que o *C. bovis* seja um micro-organismo psicrotrófico, mas sim que a presença deste agente está relacionada a uma contaminação ambiental inicial muito alta, como aquelas encontradas em sistemas de ordenha com problemas de higiene. São contrários ainda aos de Faria (21) e Santos et al. (22) que não consideraram sua capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. Por outro lado Dommett (5) afirmou que os micro-organismos psicrotróficos mais encontrados após os processos de pasteurização, são os corineformes.

Da mesma forma Thomas (7), Sorhaug e Stepaniak (8), Santana et al. (9) e Chen et al. (12) referiram que micro-organismos do gênero *Corynebacterium spp* se multiplicam sob temperatura de refrigeração e corroboram com o presente estudo, permitindo-se nestas condições, afirmar que *C. bovis* é um microorganismo psicrotrófico.

Quanto a pesquisa dos genes lipA, os resultados revelaram que *C. glutamicum* utilizado como controle positivo, apresenta a seqüência alvo pesquisada, com a formação da banda de 397bp, indicando a presença do gene lipA em seu genoma o que não ocorreu com nenhuma das amostras de *C. bovis* analisadas.

A ausência de informações na literatura sobre pesquisa de genes produtores de lipases e proteases no DNA de *C. bovis*, não permite uma discussão mais profunda, porém analisando os resultados obtidos e baseados nas condições do presente experimento, pode-se afirmar que o *C. bovis* não apresenta o gene lipA. Portanto quando Faria (21) e Santos et al. (22) afirmaram que micro-organismos do gênero *Corynebacterium spp.* produzem lipases e proteases termo-resistentes, provavelmente esta produção se relacione a outros genes não pesquisados no presente estudo.

Quanto a pesquisa do gene aprX, os resultados confirmaram que *B. liqueniformis*, utilizado como controle positivo, possui a seqüência alvo pesquisada para o gene aprX, o que não aconteceu em nenhuma linhagem de *C. bovis*. Portanto pode-se afirmar que o micro-organismo pesquisado, nas condições do presente experimento, não possui o gene aprX. Estes resultados são contrários aos encontrados por Faria (21), Duong et al. (23), Liao e McCallus (24) e Santos et al. (22), que afirmaram que micro-organismos psicrotróficos produzem lipases e proteases termo-resistentes, embora não se possa afirmar que tais micro-organismos não produzam outras enzimas proteolíticas codificadas por outros genes não pesquisados no presente estudo.

Assim, pode-se concluir que *C. bovis* possui a capacidade de se multiplicar sob temperatura de refrigeração, o que foi verificado no presente estudo, podendo comprometer a qualidade do leite armazenado por longos períodos de tempo. Conclui-se ainda que a não detecção dos genes aprX e lipA no DNA do micro-organismo, indica que *C. bovis* não produz proteases e lipases codificadas por estes genes, e que a refrigeração do leite cru nas propriedades leiteiras pode favorecer a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos, como os corineformes, os quais podem promover alterações na composição do leite cru e de seus derivados.

REFERÊNCIAS

1. Domingues PF. Novas tendências no tratamento da mastite bovina. In: Anais do 2º Encontro de pesquisadores em mastite bovina do estado de São Paulo; 1996, Nova Odessa. Nova Odessa; 1996. p.33-43.
2. Muciollo P. Aspecto da inspeção e fiscalização higiênico-sanitária do leite. Rev Inst Laticínios Candido Tostes. 1977;(nov-dec):15-9.
3. Yurukov M, Todorov D. Aetiology of sub clinical mastitis in cows of various breeds in Bulgaria. Vet Med Nauki. 1977;14:263-6.
4. Counter DE. Outbreak of bovine mastitis associated with *Corynebacterium bovis*. Vet Rec. 1981;108:560-1.
5. Dommett TW. Spoilage of aseptically packaged pasteurized liquid dairy products by thermotrophic psychrotrophs. Food Aust. 1992;44(10):459-61.
6. Victoria C, Da Silva AV, Elias AO, Langoni H. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. Arq Cienc Vet Zool. 2005;8(2):161-4.
7. Thomas SB. Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk. Milchwissenschaft. 1966;27:270-5.
8. Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. Trends Food Sci Technol. 1997;8:35-40.
9. Santana EHW, Beloti V, Barros MAF. Microrganismos psicrotóxicos em leite. Hig Aliment. 2001;15(88):27-33.
10. Barbano DM, Ma Y, Santos MV. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf-life. J Dairy Sci. 2006;89 suppl:E15-9.
11. Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Ruddan MA, Boor KJ. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J Dairy Sci. 2000;88:264-74.
12. Chen L, Daniel RM, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. Int Dairy J. 2003;13:255-75.
13. Collins EB. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. J Dairy Sci. 1981;64(1):157-60.
14. Dieckelmann M, Johnson LA, Beacham IR. The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. J Appl Microbiol. 1998;85:527-36.
15. Duong F, Bonnet E, Geli V, Lazdunski A, Murgier M, Filloux A. The aprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. Gene. 2001;262:147-53.
16. Schalm OW, Noorlander DO. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. J Am Vet Med Assoc. 1957;130:199-204.

17. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2005.
18. Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbach S. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. J Dairy Sci. 2000;83:2373-9.
19. Nunes ELC, Dos Santos KR, Mondino PJ, Bastos MCF, Giambiagi-Demarval M. Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;34:77-81.
20. Bramley AJ, Mckinnon CH. The microbiology of raw milk. In: Dairy microbiology: the microbiology of milk. 2ª ed. London/NewYork: Elsevier Science Ltda; 1990. p.163-207.
21. Faria JAF. Vida de prateleira do leite de consumo. Inf Agropecu. 1986;12(137):38-45.
22. Santos ES, Carvalho EP, Abreu LR. Psicrotóxicos: conseqüências de sua presença em leites e queijos. Bol Soc Bras Cienc Tecnol Aliment. 1999;33(2):129-38.
23. Duong F, Lazdunski A, Cami B, Murgier M. Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to other secretory pathways. Gene. 1992;121:47-54.
24. Liao C, McCallus DE. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. Appl Environ Microbiol. 1998;64(3):914-21.

Recebido em: 16/02/11

Aceito em: 02/05/11