

***Clostridium estertheticum* em leite cru e em queijos parmesão e provolone: padronização da técnica do PCR e ocorrência*.**

OLIVEIRA, Flávia Isabel da Rocha^{1*}; RAUECKER, Ursula Nunes²; DIAS, Thays de Lima¹; FRANÇA, Leonardo²; NUNES, Iolanda Aparecida²; MESQUITA, Albenones José de²

¹ Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos ² Escola de Veterinária
flaviario@yahoo.com.br / Projeto financiado pela CAPES

Palavras-Chave: *Clostridium*, deterioração tardia, lácteos, PCR.

1. INTRODUÇÃO

Tem-se verificado a ocorrência de deterioração em queijos, conhecida como “tufamento tardio”, principalmente naqueles classificados como duros e semi-duros (FURTADO; 1985), tendo sido identificados *Clostridium butyricum*, *C. tirobutyricum* e *C. sporogenes* (PERRY, 2004; FURTADO, 1990).

Este tipo de deterioração caracteriza-se pela fermentação do lactato, que produz na massa o ácido butírico, gás carbônico e hidrogênio (SERAPHIM e SIQUEIRA; 2000). O acúmulo destes gases determina o tufamento interno, com número variável de olhaduras grandes e irregulares, podendo apresentar, ainda, trincas na casca, odor de ranço desagradável e sabor estranho devido ao ácido butírico (FURTADO, 1985; PERRY, 2004). O tufamento tardio representa um problema na comercialização dos queijos, pois sua ocorrência se dá até oito semanas após a fabricação (SENIK et al., 1989), indicando que o produto pode estar nos pontos de venda ou até mesmo nas residências dos consumidores quando apresentar o problema.

Características semelhantes foram verificadas em carnes refrigeradas embaladas a vácuo, tendo sido identificadas outras espécies de *Clostridium*, dentre elas *C. estertheticum* (HELPS et al., 1999; BRODA et al., 2003a; BRODA et al., 2003b). No Brasil, esta espécie foi identificada recentemente em carnes bovinas com tufamento tardio em diferentes matadouros-frigoríficos (RAUECKER et al., 2005).

Considerando que *C. estertheticum* consiste em uma bactéria psicrófila, estritamente anaeróbia e formadora de esporos (COLLINS et al., 1992), sua presença em queijos e leite cru não pode ser desconsiderada. Desta forma, o presente trabalho objetivou determinar a ocorrência de *C. estertheticum* em leite cru e queijos parmesão e provolone, através da técnica de PCR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Para o pré-experimento foram utilizadas amostras de leite cru destinadas à Contagem Bacteriana Total (CBT) e à Contagem de Células Somáticas (CCS), no Centro de Pesquisa em Alimentos, e amostras de leite cru sem conservante oriundas da Fazenda Modelo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, para verificar se há interferência do conservante adicionado às amostras para CBT (azidiol) e CCS (bronopol) na extração do DNA.

Caso não haja interferência, essas amostras comporão o experimento, totalizando 142 unidades, distribuídas proporcionalmente ao número de cada estabelecimento de leite e derivados.

As amostras de queijos parmesão e provolone serão coletadas no mercado varejista de Goiânia, Goiás, produzidas na região do Centro-Oeste, totalizando 60 unidades, sendo 30 de cada tipo de queijo.

2.2 Processamento das amostras e extração de DNA genômico

As amostras de leite e queijo serão submetidas à extração direta, sem pré-enriquecimento e à extração após incubação em caldo não seletivo para anaeróbios em jarras de anaerobiose, após cinco, dez, vinte e quarenta dias, em temperatura de 10°C. Para o pré-enriquecimento serão utilizados 20mL de caldo cérebro coração (BHI), pré reduzidos a 100°C/10min. As amostras serão submetidas ao choque térmico a 80°C/10min, antes de se iniciar as extrações ou sementeiras em caldo, a fim de se induzir a germinação dos esporos.

A extração do DNA cromossômico de amostras de leite e queijos será conduzida de acordo com a metodologia proposta por van SOOLINGEN et al. (1991) com algumas modificações, na qual 2mL de leite ou 2g da amostra de queijo serão homogeneizadas em 20mL de solução salina 0,85%. Desta suspensão, será retirada uma alíquota de 2mL para a extração direta e 2 mL para extração após incubação. À suspensão será adicionado 500µL de tampão Tris-EDTA (TE, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) e 50µL de lisozima 10% e incubado por 18 horas à 37°C. A seguir procederá com a adição de 70µL de dodecilsulfato de sódio a 10% e novamente incubado à 65°C por 10 minutos, a esta solução acrescentará 100µL de solução de NaCl 5M e 80µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 10%, homogeneizará e será incubado a 65°C/10 min.

Em seguida, adicionará igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) homogeneizará vigorosamente e centrifugará por 15 minutos à 10.000rpm. O fluido sobrenadante será transferido para um tubo limpo e será adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitando em seguida e centrifugado por 20 minutos à 10.000rpm. A camada superior será transferida para um tubo limpo e 700µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) serão adicionados, misturados através de agitação e centrifugados por 15 minutos à 10.000rpm.

A camada superior será transferida para um tubo novo e adicionará 1mL de etanol a 96% (-20°C). O tubo será agitado vigorosamente por algumas vezes e estocado durante toda a noite à -20°C. Depois o tubo será centrifugado por 15 minutos à 10.000rpm e a parte líquida será removida tanto quanto possível. Adicionará 2mL de etanol 70%, misturado brevemente e centrifugado rapidamente. O líquido será removido tanto quanto possível e o “pellet” será submetido à secagem à 37°C por 12 horas, quando então será dissolvido em 100µL de tampão TE.

2.3 Amplificação por PCR

As reações serão desenvolvidas em tubos estéreis de 0,2mL, com um volume final de 50µL. As misturas das reações consistirão de 5µL de tampão 10X; 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de cada um dos trifosfatos desoxynuceosídeos (dNTP); 1U de *Taq* DNA polymerase e 0,3mM de cada “primer” (oligonucleotídeo). A seguir será adicionado 5µL de solução de DNA.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores escolhidos para *Clostridium estertheticum* são os que foram desenhados por Helps et al. (1999) e os por Broda et al. (2003b). O par de iniciadores (primers) desenhados por Helps et al. (1999) é: *Revised primer forward (Clostridium estertheticum)* 5' TGA TCG CAT GAT CTT AAC

ATC AAA G 3' e *Revised primer reverse (Clostridium estertheticum)* 5' TCG ACC CCC GAC ACC TAG TAT T 3', que produz um produto de PCR de 641 pares de bases (pb). O par de iniciadores (primers) desenhados por Broda et al. (2003b) é: 16SEF 5' TCG GAA TTT CAC TTT GAG 3' e 16SER 5' AAG GAC TTC ACT CAT CTC TG 3', que produz um produto de PCR de 790 pb.

As condições das reações de PCR serão as descritas por HELPS et al (1999) e BRODA et al (2003b), nas quais serão utilizadas as mesmas condições de amplificação, com um ciclo de 5 minutos à 94°C, 40 ciclos de 1 minuto à 94°C (para desnaturação, 1 minuto à 60°C (para anelamento) e 1 minuto à 72°C (para extensão final) e um ciclo de 10 minutos à 72°C (para extensão final).

Os produtos da reação de PCR serão analisados através de eletroforese em gel de agarose de 1% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídio com voltagem de 110V para a corrida do gel. Sua visualização será em transluminador ultravioleta e fotografados com câmara Polaróide.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O projeto encontra-se em fase inicial, sendo testadas apenas o protocolo de extração e, por isso ainda não foram analisados estatisticamente. Até o momento foram analisadas 18 amostras, sendo 13 de leite cru enviadas ao Centro de Pesquisa em Alimentos para realização das contagens bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS), para verificar os efeitos dos conservantes azidiol e bronopol adicionados às amostras para a realização das contagens sobre a qualidade do DNA genômico em comparação com o leite puro; e cinco de queijos parmesão e provolone (um de parmesão e quatro de provolone), para a padronização dos procedimentos de extração.

O protocolo proposto foi testado tanto para as amostras de leite quanto para as de queijo com incubação em jarra de anaerobiose, obtendo extração de DNA apenas nas amostras de leite puro e queijo, o qual apresentou baixo rendimento. Assim, o protocolo de extração foi modificado com o intuito de apresentar melhor rendimento.

Para as amostras de leite, com exceção da lisozima, todos os reagentes foram duplicados (Protocolo 2) e triplicados (Protocolo 3) e para as amostras de queijo, aumentou-se a quantidade de TE para 1000µL, e o restante dos reagentes foram quadruplicados (Protocolo 4) e a quantidade de lisozima foi elevada para 200µL (Protocolo 5). Os géis de concentração de DNA destes protocolos, para a averiguação da quantidade e qualidade do DNA extraído são apresentados nas figuras 1 e 2.

As amostras de leite apresentaram restrição quanto ao protocolo utilizado, sendo que pelos protocolos 1 e 2 observou-se que as amostras com conservantes (azidiol e bronopol) interferiram na extração. No entanto ao se testar o protocolo 3, 67% das amostras com azidiol e 17% das amostras com bronopol apresentaram extração de DNA, porém em 77% das amostras verificou-se um "rastros" de DNA degradado, o que não descarta a possibilidade de presença de DNA.

As amostras de queijo apresentaram extração de DNA em todos os protocolos testados, porém no protocolo 5 a extração apresentou maior rendimento e integridade de DNA.

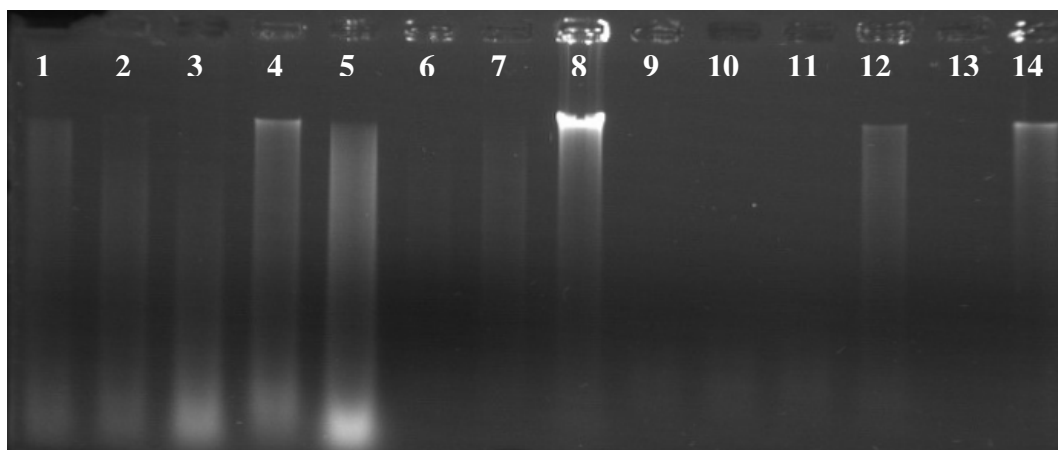


Figura 1: Gel de Concentração; 1 a 5 (amostras de queijo); 6 e 10 (amostras de leite com bronopol), 7, 9 e 12 a 14 (amostras de leite com azidol), 8 e 11 (amostras de leite puro). 1 a 5 (protocolo 4), 6 a 8 (protocolo 2); 9 a 14 (protocolo 3)

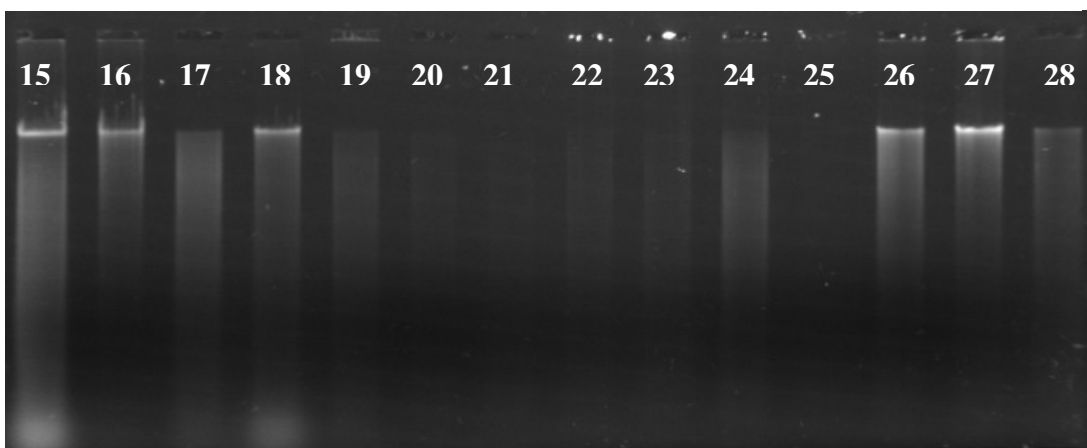


Figura 2: Gel de Concentração. 15 a 17 (amostras de leite com azidol); 18 a 23 (amostras de leite com bronopol); 24 a 28 (amostras de queijo). 15 a 23 (protocolo 3), 24 a 28 (protocolo 5).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os protocolos de extração de DNA, tanto para as amostras de leite quanto para as de queijo necessitam ser revistos para aumentar a qualidade e quantidade do DNA extraído,
- As amostras de leite com conservante enviadas ao CPA para análise de CBT e CCS constituirão o grupo de amostras para análise de *Clostridium estertheticum*;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRODA, D. M.; MUSGRAVE, D. R.; BELL, R. G. Molecular differentiation of clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis. **International Journal of Food Microbiology**. v.84, n.1, 2003a, p.71-77.

BRODA, D. M.; BOEREMA, J. A.; BELL, R. G. PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats. **Journal of Applied Microbiology**. v.94, 2003b, p.515-522.

COLLINS, M. D.; RODRIGUES, U. M.; DAINY, R. H.; EDWARDS, R. A.; ROBERTS, T. A. Taxonomics studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: Description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**, v.96, n.2-3, 1992, p.235-239.

FURTADO, M. M. O estufamento tardio dos queijos: características e prevenção, uma revisão. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v.40, n. 242, p.3-39, 1985

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Ed. Globo, 1990, 297p.

HELPS, C. R.; HARBOUR, D. A.; CORRY, J. E. L. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. **International Journal of Food Microbiology**. v.52, n.1-2, 1999, p.57-65.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27, n. 2, 2004, p.293-300.

RAUECKER, U. N.; NUNES, I. A., MIGUEL, M. P., RAMOS, R. R., PUÇA, M. L. L., FRANÇA, L., MORI, A., BUENO, C. P., MESQUITA, A. J. M. Detecção de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*, incriminados na deterioração de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo, através da técnica de PCR. In: **CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG -CONPEEX, 2., 2005**, Goiânia. Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

SENIK, G. F., SCHEIB, J. A., BROWN, J. M., LEDFORD, R. A. Evaluation of methods for determination of spore-formers responsible for the late gas blowing defect in cheese. **Journal Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 360-366, 1989.

SERAPHIM, K. R. e SIQUEIRA, M. E. P. B. de. Nitratos e nitritos em queijos caseiros e industrializados comercializados na região sul de Minas Gerais, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v.50, n.1, Caracas, 2000.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; HAAS, P. E. W.; SOLL, E. R. van EMBDEN, J. D. A. Occurrence and stability of insertion sequences in sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiology**, 29, p 2578-86, 1991.