

Estudo comparativo da comunidade bacteriana do leite biológico e convencional

Dissertação de Mestrado

Nuno Miguel Lopes Paiva

Mestrado em
Engenharia Zootécnica



Angra do Heroísmo
2021/2022

Estudo Comparativo da Comunidade Bacteriana do Leite Biológico e Convencional

Dissertação de Mestrado

Nuno Miguel Lopes Paiva

Orientador(a)

Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva

Coorientador(a)

Doutora Susana Ribeiro

Dissertação de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Zootécnica.



Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de algum modo contribuíram para a realização desta dissertação, nomeadamente:

À minha orientadora, Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva, pela orientação, ajuda, disponibilidade, paciência, incentivo, ensinamentos e dedicação demonstrados ao longo deste trabalho.

À minha coorientadora, Doutora Susana Ribeiro, pela ajuda, orientação, disponibilidade, amizade, paciência, boa energia e dedicação fornecida ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor Moreira da Silva pela cedência das listagens de produtores de leite biológico.

Aos produtos de leite, principalmente ao senhor Anselmo Pires por ter-me introduzido no meio dos produtores de leite biológico de forma descontraída, permitindo que conseguisse aceder às amostras para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Investigação e Tecnologia Agrária e do Ambiente – IITAA (Projeto UIDB/00153/2020), e ao grupo de Ciência dos Alimentos e Saúde, por me terem proporcionado a oportunidade e as condições laboratoriais para realizar este trabalho.

Às minhas colegas de laboratório Dominika Jurášková e Sofia Silva, pelo companheirismo e ajuda sempre que necessitava.

Aos meus colegas e amigos de residência que de diversas formas me apoiaram quando necessitava.

Aos meus pais pela compreensão e por me aturarem nas horas de maior tormento.

A alguém muito especial que foi o meu pilar mental e emocional em todos os eventos diários.

E por último, mas não menos importante, à TASMUA, a minha tuna. Que funcionou como a minha segunda família.

Resumo

O leite biológico certificado provém de vacas que vivem e se alimentam diariamente no pasto, sem o uso de pesticidas ou fertilizantes químicos sintéticos, contribuindo para a proteção do meio ambiente, bem-estar animal e desenvolvimento rural sustentável. Este é o primeiro estudo da comunidade microbiana do leite produzido nos Açores onde se comparam os sistemas de produção biológico e convencional. Foram coletadas 40 amostras de leite, sendo 20 de produção biológica e 20 de produção convencional em duas estações: inverno e primavera. A identificação da comunidade bacteriana foi realizada por amplificação da região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA e sequenciação pela plataforma Illumina. As atribuições taxonômicas para os ASVs foram determinadas usando o banco de dados SILVA. Não se observaram diferenças nos diferentes índices de biodiversidade ($P > 0.05$) entre o leite convencional e biológico, embora se tenham registado uma redução no número de indivíduos ($P < 0.05$) e aumento da equitabilidade ($P < 0.05$), refletindo um menor número de espécies dominantes no leite produzido no modo convencional no inverno. Em ambos os sistemas de produção o leite apresentou uma microbiota dominada pelos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota* e *Bacteroidota*, destacando-se 13 géneros dominantes: *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Macrococcus*, *Thermoanaerobaculaceae* – Subgroup 10, *Clostridium sensu stricto* 1, *Corynebacterium*, *Aerococcus*, *Romboutsia*, *Lachnospiraceae NK3A20* e *Leuconostoc*. O leite em modo de produção biológico apresentou também uma maior heterogeneidade entre explorações, refletida pela dispersão dos índices de diversidade e pela grande variação nas abundâncias relativas dos géneros dominantes observados nas diferentes amostras. Estes resultados foram confirmados pela análise PCoA, onde se registou uma dispersão das amostras produzidas em modo biológico, em contraste com as amostras de leite produzido no sistema convencional, que apresentaram um elevado nível de similaridade tanto na primavera como no inverno. Neste sistema de produção, observou-se também uma clara separação da comunidade bacteriana entre o leite produzido no inverno e na primavera. Já no modo de produção biológico, devido à prática do pastoreio durante todo o ano, essa distinção não foi observável. A análise de LEfSe identificou alguns géneros como diferenciadores do modo de produção biológico. Destes, destacam-se os géneros *Bacillus*, *Iamia* e *Nocardioides*, associados à microbiota do solo nos sistemas de produção biológico, bem como o género *Christensenellaceae group R7* com um potencial efeito benéfico para a saúde.

Abstract

Certified organic milk comes from cows that live and are fed daily on pasture without the use of pesticides or synthetic chemical fertilisers. This contributes to environmental protection, animal welfare and sustainable rural development. This is the first study on the microbial community of milk produced in the Azores comparing organic and conventional production systems. Forty milk samples were taken, 20 from organic and 20 from conventional production in two seasons: Winter and Spring. Identification of the bacterial community was done by amplification of the hypervariable region V3-V4 of the 16S rRNA gene and sequencing with the Illumina platform. The taxonomic assignments of the ASVs were determined using the database SILVA. No differences were found in the different biodiversity indices between conventional and organic milk ($P > 0.05$), although the number of individuals decreased ($P < 0.05$) and equitability increased ($P < 0.05$), indicating a lower number of dominant species in the conventionally milk produced in winter. In both production systems, the milk had a microbiota dominated by the phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota* and *Bacteroidota*, with 13 dominant genera: *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Macrococcus*, *Thermoanaerobaculaceae* – Subgroup 10, *Clostridium sensu stricto* 1, *Corynebacterium*, *Aerococcus*, *Romboutsia*, *Lachnospiraceae* NK3A20 and *Leuconostoc*. Organic milk also showed greater heterogeneity between farms, as reflected in the dispersion of diversity indices and the large variation in the relative abundances of the dominant genera in the samples. These results were confirmed by the PCoA analysis, where a scattering of the organic samples was found, in contrast to the conventional milk samples, which showed a high degree of similarity in both spring and winter. In this production system, a clear separation of the bacterial community between the milk produced in winter and spring was also observed. In the organic production system, this distinction was not observed due to year-round grazing. The LEfSe analysis identified some genera as distinguishing features of the organic production method. Of these, the genera *Bacillus*, *Iamia* and *Nocardioides* stand out as being associated with soil microbiota in organic production systems, as well as the genus *Christensenellaceae* group R7 with a potential positive effect on health.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
I – Introdução	3
II – Revisão Bibliográfica.....	7
1 – Sistemas de produção	7
1.1 – Modo de produção convencional.....	10
1.2 – Modo de produção biológico.....	11
1.2.1 – Aspetos históricos	11
1.2.2 – Produção Biológica	13
1.2.3 – Período de conversão.....	15
1.2.4 – Produção de leite biológico	17
1.2.5 – Características distintas do leite biológico	19
2 – Leite	20
3 – Biossíntese do leite de vaca	21
4 – Composição físico-química do leite	23
4.1 – Água	25
4.2 – Glicídios	25
4.3 – Lípidos	27
4.4 – Proteínas	31
4.4.1 – Micelas de Caseína	33
4.4.2 – Proteínas do soro	35
4.4.3 – Fatores que afetam a proteína do leite	37
4.5 – Minerais.....	39
4.5.1 – Fatores que afetam os minerais.....	40
4.6 – Vitaminas.....	41
4.7 – Características Organoléticas.....	42
5 – Metabolismo da lactação na vaca.....	44
6 – Microbiota do leite.....	47
6.1 – Bactérias do ácido láctico.....	49

6.2 – Bactérias deteriorantes.....	50
6.3 – Bactérias patogénicas	51
III – Trabalho Experimental	52
1 – Materiais e Métodos	52
1.1 – Descrição das explorações	52
1.2 – Amostragem	53
1.3 – Extração de DNA das amostras.....	54
1.4 – Análise e Estatística.....	55
2 – Resultados e Discussão	56
2.1 – Análise da biodiversidade bacteriana por sequenciação de nova geração	56
2.2 – Biodiversidade alfa	56
2.3 – Composição taxonómica das comunidades bacterianas.....	62
2.4 – Espécies identificadas dentro do filo <i>Firmicutes</i>	70
2.4 – Comparação das comunidades bacterianas	73
2.2 – Análise discriminante linear (LEfSe).....	75
3 – Conclusões	81
IV – Referências Bibliográficas	83
V – Anexos	103