

Microbiological quality of milk in nature during the process of obtaining and after cooling*

Calidad microbiológica natural de la leche durante el proceso de ordeño y después de refrigerarse

Qualidade microbiológica do leite in natura durante o processo de obtenção e após o resfriamento

Karina Elizângela Manfrin Scabin¹, Aluna MV; Dora Inés Kozusny-Andreani², DrSci; Danila Fernanda Rodrigues Frias^{3*}, DrSci

**Autor para correspondencia: Danila Frias. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. danilafrias@yahoo.com.br*

¹Aluna de Medicina Veterinária da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo), Campus de Fernandópolis, São Paulo, Brasil. y Semillero de Investigación en Fauna Silvestre – Ankoré

²Doutora em microbiologia da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo), Laboratório de Microbiologia, Campus de Fernandópolis, São Paulo, Brasil.

³Doutora em Medicina Veterinária Preventiva. Programa Embrapa Geneplus, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

(Recibido: 15 de abril de 2012; aceptado: 25 de mayo de 2012)

Abstract

The present study aimed to check for changes in the microbiological quality of milk in *natura* during the process of obtaining and after cooling, analyzing the action of teatcups as potential sources of contamination. We analyzed 120 samples of milk samples and teatcups collected in different periods from a dairy farm located in Auriflora, São Paulo State, Brazil. Microbiological analyses were carried out in accordance with the rules in force for determination of microorganisms in food and equipment. It was observed a high number of *Staphylococcus aureus* (76.6% of the samples). In 53.33% it was found coliform contamination by total coliforms, 35% by thermotolerant coliforms and *Escherichia coli*. No samples presented *Salmonella* contamination. In the milk collected after cooling, in March, it was observed high *mesophilic* aerobic counts. *Staphylococcus aureus* and thermotolerant Coliforms were present in all samples analyzed. *E. coli* was isolated in samples of March and April. On the evaluation of swabs of teatcups, it was found *E. coli* and *S. aureus*. It is concluded and that the milk shall be

*Para citar este artículo: Scabin KEM, Kozusny-Andreani DI, Frias DFR. 2012. Qualidade microbiológica do leite in natura durante o processo de obtenção e após o resfriamento. Rev CES Med Vet Zootec; Vol 7 (1): 11-21

collected from hygienic way, associated with mastitis control programs and hygiene equipment, mainly at the time of greatest rainfall, once the number of microorganisms increases and the refrigeration does not improve the quality of the product, it just keeps it.

Key words

Escherichia coli, mastitis, milk, *Staphylococcus aureus*, teatcups.

Resumen

El estudio actual tiene el propósito de verificar los cambios en la calidad microbiológica natural de la leche durante el proceso de ordeño y después de refrigerada, analizando la acción de las tazas como fuente potencial de contaminación. Analizamos 120 muestras de leche y las tazas recolectadas en diferentes momentos en una finca lechera en Auriflama, estado de Sao Paulo en Brasil. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo siguiendo las reglas vigentes para determinar los microorganismos en los alimentos y en los equipos. Se encontraron una gran cantidad de estafilococos aureus (76.6% de las muestras). Se encontró contaminación con coliformes en un 53,33%, y en 35% con coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*. No se encontró contaminación con salmonela en ninguna de las muestras. En la leche que fue recogida después de refrigerarse, en marzo, se observaron altos niveles de mesofílicos aerobios. Había presencia de *Staphylococcus aureus* y coliformes termotolerantes en las muestras analizadas. Se aisló el *E. coli* de las muestras de Marzo y abril. Al evaluar las muestras de copitos de algodón tomado de las tazas, se encontraron *E. coli* y *S. aureus*. En conclusión la leche se tiene que recolectar de la forma más higiénica posible, asociada con programas de control de la mastitis y equipos de higiene, principalmente durante los períodos muy lluviosos, y el número de microorganismos se aumenta y la refrigeración no mejora la calidad del producto, sino que simplemente, la mantiene.

Palabras clave

Escherichia coli, mastitis, leche, *Staphylococcus aureus*, pezoneras.

Resumo

O Presente trabalho teve como objetivo verificar as alterações na qualidade microbiológica do leite in natura durante o processo de obtenção e após refrigeração analisando a ação das teteiras como potenciais fontes de contaminação. Foram analisadas 120 amostras de leite e swabs de teteiras coletados em diferentes períodos provenientes de uma granja leiteira localizada em Auriflama, Estado de São Paulo, Brasil. No leite em processo de obtenção as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos no mês de março foi alta. Os meses de março e abril apresentaram elevadas contagens de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) em 76,6% das amostras. Em 53,33% encontrou-se contaminação por coliformes totais, 35% por coliformes termotolerantes e por *E. coli*. Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Salmonella*. No leite coletado após refrigeração, no mês de março, constatou-se contagens de aeróbios mesófilos elevadas. *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e termotolerantes estiveram presentes em todas as amostras analisadas. *Escherichia coli* foi isolada nas amostras de março e abril. Na avaliação dos swabs de teteiras, encontrou-se *E. coli* e *S. aureus*. Conclui-se que o leite deve ser coletado de maneira higiênica, associado a programas de controle de mastite e higiene de equipamentos, principalmente na época de maior índice pluviométrico pois o número de microrganismos aumenta e a refrigeração não melhora a qualidade do produto, apenas a mantém.

Palavras chave

Escherichia coli, leite, mastite, *Staphylococcus aureus*, teteiras.

Introdução

O sistema agro-industrial do leite, devido a sua enorme participação no contexto social, é um dos mais importantes do país. A atividade é praticada em todo o território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera inúmeros empregos e agrega valores à produção agropecuária nacional. Nos últimos anos, três fatores marcaram o setor leiteiro nacional: o aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo do valor agregado ao produto pago aos produtores³⁹.

Em 2010, o Brasil produziu 30.715 bilhões de litros de leite, sendo que aproximadamente, 31,7% deste volume era de leite não inspecionado⁷. O destino deste leite é o mercado informal, onde o produto pode ser vendido diretamente ao consumidor (*in natura*) ou ser comercializado na forma de derivados produzidos por pequenos laticínios. A venda informal é uma importante alternativa de comercialização para o pequeno produtor, que encontra uma demanda bem estabelecida no país²⁴. Entretanto, esta forma de comercialização, além de proibida⁵, gera problemas como a concorrência desleal com laticínios recolhedores de impostos e elevação dos riscos à saúde do consumidor²¹.

Como o leite é um produto que está presente na alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais destacando-se, principalmente na dieta de crianças e idosos, a higiene na obtenção e o controle de qualidade do leite e derivados devem ser feitos com critério visando assegurar a sua inocuidade, pois com a carga microbiana elevada já no momento da coleta, o resultado será um leite de baixa qualidade³⁸.

No Brasil, o leite *in natura* apresenta, em geral, uma alta contagem de aeróbios mesófilos e coliformes, indicando deficiência na higiene de produção³⁵. O número de microrganismos é um reflexo da qualidade do leite, das condições de ordenha e armazenamento do produto³⁴.

Por sua composição química, o leite é um alimento de extremo valor na dieta humana, mas pela mesma razão, constitui-se em excelente substrato para o crescimento de grande diversidade de microrganismos heterótrofos que, como o homem, utilizam os princípios nutritivos presentes nesse alimento para sua sobrevivência. A atividade de alguns microrganismos também pode ser benéfica para o homem, visto que eles participam

ativamente das mudanças físicas, químicas e organolépticas do leite durante a fabricação de diversos produtos lácteos. Por outro lado, a atividade microbiana incontroleável é prejudicial e leva à alteração deste, tornando-o inadequado para o consumo. Em outros casos, os microrganismos patogênicos presentes no leite podem causar graves problemas à saúde humana²⁵. Para reduzir este problema utiliza-se a prática do resfriamento do leite a temperaturas abaixo de 5 °C em poucas horas após sua obtenção e manutenção desta temperatura até o processamento³⁶.

A contaminação do leite pode ocorrer nas zonas inferiores do interior do úbere, e quando o produto é extraído também fica exposto a múltiplas contaminações externas (do animal, do ar, da água e dos utensílios utilizados durante sua coleta). Desta forma a saúde da glândula mamária, a higiene da ordenha, o ambiente em que a vaca fica alojada e os procedimentos de limpeza do equipamento ordenha são fatores que afetam diretamente a qualidade do leite cru. Atualmente a contaminação de maior relevância é a dos utensílios da granja leiteira (ordenhadeiras, tanques, cisternas transportadoras, tubulações e silos). Adicionalmente são também importantes a temperatura e o período de armazenagem do leite, uma vez que estes dois fatores estão diretamente ligados com a multiplicação dos microrganismos, por isso, é necessário que o leite chegue à indústria o mais rápido possível e com temperatura de refrigeração próxima a 4 °C²⁵.

A qualidade microbiológica do leite não indica apenas a saúde da glândula mamária, mas também as condições gerais de manejo e higiene adotados na fazenda e indústrias processadoras. Esse aspecto microbiológico de maneira geral interfere na qualidade industrial do leite e derivados²⁰. Além disso, está diretamente relacionado a vida útil dos produtos lácteos, ao desenvolvimento de sabores indesejáveis no produto e, em menor escala, a diminuição no rendimento industrial³⁶.

Mundialmente, indústria leiteira atravessa um período de intensas transformações em sua estrutura²⁹. Recentemente, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou a Instrução Normativa nº 51, que estabelece o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Tipo A, Tipo B, Tipo C e Leite Cru Refrigerado visando atender à demanda dos consumidores por qualidade e segurança alimentar, porém a oferta de leite de boa qualidade exige uma série de medidas de controle em todas as etapas da cadeia.

de produção^{6,14}. Por isso, o presente trabalho objetivou avaliar leite *in natura* no momento de sua obtenção e após refrigeração e também a condição higiênica das teteiras utilizadas durante a ordenha mecânica, com a finalidade de verificar se existe alteração na qualidade microbiológica do produto durante o processo de obtenção até a refrigeração, e se as teteiras atuam como potenciais fontes de contaminação do produto final.

Material e metodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Camilo Castelo Branco, Campus de Fernandópolis, São Paulo. Foram empregadas, para análise da qualidade microbiológica amostras de leite cru (*in natura*) e para verificação da higiene dos equipamentos, foram colhidos swabs de teteiras.

Amostragem de leite

As amostras de leite cru foram obtidas em uma granja leiteira do município de Auriflora, São Paulo. Os animais utilizados no experimento eram mantidos em piquetes e conduzidos ao curral apenas no momento da ordenha. A obtenção do leite era realizada mecanicamente e o mesmo resfriado imediatamente em tanque de expansão próprio.

A seleção dos animais se deu de forma casualizada. Foram realizadas 4 amostragens em diferentes períodos (março a junho), totalizando 30 amostras por amostragem.

O leite foi colhido de todos os quartos mamários. Após a retirada e descarte dos primeiros jatos de leite, foi realizada uma cuidadosa anti-sepsia dos tetos com solução de Iodo e posterior secagem com papel toalha descartável. Em seguida, foi realizada a desinfecção da extremidade posterior do teto e esfínter do teto com algodão embebido em álcool a 70% (v/v). Os jatos de leite foram colhidos diretamente em frascos estéreis com rosca. As amostras do tanque de expansão também foram colhidas no mesmo tipo de frasco. Todas as amostras de leite cru (*in natura* e resfriado) foram identificadas, colocadas em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas imediatamente ao laboratório para processamento.

Coleta de swabs de teteiras

Visando verificar a higiene das teteiras *swabs* foram coletados. Após colheita das amostras os *swabs* foram

depositados em tubos de ensaio contendo meio Stuart e conservados em caixas isotérmicas contendo gelo sendo mantidas refrigeradas até o momento da análise microbiológica.

Análises microbiológicas

Para realização das análises microbiológicas os meios de cultura empregados foram: ágar triptone soja (TSA), agar Hektoen, agar de Levine (EMB), agar Baird-Parker, caldo Lauril sulfato e caldo verde brilhante.

De cada amostra de leite, foram colhidos assepticamente 25 mL, os quais foram transferidos para 225 mL de água salina peptonada 0,1% (p/v) estéril (diluição 1:10). A partir da diluição inicial (1:10), a diluição 1:100 e 1:1000 foram preparadas. As três diluições foram usadas para posterior procedimento microbiológico.

Procedimentos microbiológicos

O material dos *swabs* foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura, e em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37 + 0,5 °C por 48h.

Para a análise de bactérias aeróbias mesófilas, foram pipetadas, em Placas de Petri (100x20 mm) esterilizadas, alíquotas de 1mL de cada uma das três diluições da amostra de leite, fazendo de cada diluição placas em duplicata. Foram adicionados, a cada placa, 15 a 20 mL de Ágar Padrão para contagem, previamente resfriado à temperatura de 44 a 46 °C. Em seguida, foi homogeneizado com movimentos suaves em forma de oito (cerca de 10 vezes) e deixado a temperatura ambiente até a completa solidificação. A amostra foi incubada a 35-37 °C por 48 horas. Para a contagem, foram consideradas somente as placas da mesma diluição que apresentaram de 30 a 300 colônias. A média aritmética das colônias foi multiplicada pelo respectivo fator de diluição e o resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias/ 1,0 mL de amostra (UFC/mL).

Para contagem de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* foi empregado o método clássico do Número Mais Provável (NMP) descrito por Silva *et al.* (2007). As amostras de leite diluídas em água peptonada (0,1%) foram submetidas a teste presuntivo. Foram utilizadas três diluições por amostra. Foram inoculadas três alíquotas por diluição. A leitura foi realizada após 24 - 48h de incubação a 35 °C, e a observação

de crescimento com produção de gás foi considerada suspeita (presuntiva).

Para a confirmação de positividade, uma alçada de cada tubo suspeito foi transferida para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo *Escherichia coli* (EC). A observação de crescimento com produção de gás nos tubos VB, após 24 – 48 h de incubação a 35 °C, foi considerada confirmatória para coliformes totais. Crescimento com produção de gás nos tubos EC, após 24 h de incubação a 45,5 °C, foi considerada confirmatória para presença de coliformes termotolerantes. Os tubos de EC positivos para coliformes termotolerantes foram considerados suspeitos para presença de *E. coli*. Para confirmação, uma alçada de cada tubo foi estriada em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB). Quando se observou desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli*, estas foram isoladas para as provas bioquímicas de indol, vermelho de metila (VM), Voges Proskauer (VP) e citrato (método denominado IMViC). Foram consideradas positivas, as culturas com perfis: ++-- (biótipo 1), ou -+--(biótipo 2).

Para pesquisa de *Salmonella* utilizou-se o método clássico de presença/ausência. Este método é desenvolvido basicamente por quatro etapas: pré-enriquecimento em caldo seletivo, enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento diferencial seletivo e confirmação.

O pré-enriquecimento em caldo seletivo foi realizado através da incubação da amostra em meio caldo lactosado (CL), por 18 h. Após este período as amostras pré-enriquecidas foram cultivadas em meios de enriquecimento seletivos (Rappaport-Vassiliadis soja (RVS) e Caldo Tetrionato).

Após o cultivo em meios de enriquecimento, foi realizado plaqueamento diferencial nos meios Agar Entérico Hectoen. As colônias típicas obtidas nas placas foram confirmadas por meio de provas bioquímicas (Sistema API20E).

A presença de *Staphylococcus aureus* foi analisada pelo método de contagem direta em placas. De cada amostra de leite foram retirados 25 mL e diluídos em 225 mL de água peptonada (0,1% p/v). A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas, as quais, foram inoculados 0,1 mL e espalhadas, com pérolas de vidro, em Placas de Petri contendo Agar Baird-Parker (BP). Também foram inoculadas placas, três com 0,3 mL e uma de 0,1 mL da primeira diluição. Este procedimento foi realizado como

método e segurança, presumindo que poderiam existir amostras com contagem de *S.aureus* inferiores a 100 UFC/mL de leite. As placas inoculadas foram incubadas à 35 °C por 45 - 48 h, e em seguida foi feita a contagem das colônias típicas de *S.aureus*.

Para confirmação foram selecionadas 5 colônias típicas para o teste de coagulase e catalase. Cada colônia foi transferida para tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), onde foram perfeitamente homogeneizadas. Estes tubos foram empregados para o teste de coagulase. Em seguida, uma alçada de cada tubo de BHI foi transferida para tubos com Agar triptecase Soja (TSA) inclinados. Os tubos de TSA foram utilizados para teste da catalase e reservados também para possíveis testes adicionais. Os tubos de BHI e TSA foram incubados à 35 °C por 24 h. O testes de catalase e coagulase foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Cappuccino e Sherman (1996).

Análise dos resultados

Os dados referentes às contagens microbianas nas amostras dos diferentes grupos de microrganismos, foram analisados comparando-se as médias entre os diferentes meses por meio da análise de variância e teste de Tukey com 5% de probabilidade. Empregou-se, para as análises estatísticas, o Sistema de Análise Estatística - SAS.

Resultados e discussão

Os valores médios das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella*, e *Staphylococcus aureus* do leite colhido no momento da ordenha, para o período compreendido entre os meses de março e junho de estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Valores médios das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, e *Staphylococcus aureus* isolados de leite colhidos no momento da ordenha, durante o período de março à junho de 2008 em Auriflama, SP, Brasil.

| Época de colheita de leite | Média das contagens de microrganismos | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | Aeróbios mesófilos (UFC/mL) | Coliformes totais (NMP/mL) | Coliformes termotolerantes (NMP/mL) | <i>E.coli</i> (NMP/mL) | <i>Salmonella</i> (UFC/mL) | <i>S. aureus</i> (UFC/mL) |
| MARÇO | $1,2 \times 10^6$ a | $8,1 \times 10^4$ a | $4,5 \times 10^4$ a | $4,8 \times 10^3$ a | Ausente | $4,6 \times 10^7$ a |
| ABRIL | $7,7 \times 10^5$ b | $6,2 \times 10^4$ b | $2,9 \times 10^4$ b | $3,9 \times 10^3$ ab | Ausente | $3,5 \times 10^7$ a |
| MAIO | $5,3 \times 10^5$ c | $3,3 \times 10^4$ c | $1,8 \times 10^4$ c | $2,9 \times 10^3$ b | Ausente | $3,4 \times 10^5$ b |
| JUNHO | $2,5 \times 10^4$ d | $2,1 \times 10^4$ d | $1,5 \times 10^4$ c | $2,0 \times 10^3$ b | Ausente | $2,5 \times 10^4$ c |
| C.V.% | 9 | 13 | 18 | 17 | - | 11 |

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferenças estatísticas ($p < 0,05$); NMP: Numero Mais Provável; UFC: Unidade Formadora de Colônias.

Verificou-se na tabela 1 que o valor médio das contagens dos microrganismos aeróbios mesófilos isolados das amostras de leite cru, no mês de março excedeu os limites estabelecidos pela Instrução Normativa 51 (IN51), encontrando-se em desacordo com a legislação vigente, que determina no máximo 10^6 UFC/mL.

Fagan *et al* (2008)¹³ pesquisando padrões microbiológicos do leite em diferentes fases da lactação nas diferentes estações do ano, verificaram que no outono e primavera as contagens médias de aeróbios mesófilos foram superiores aos valores permitidos pela IN51. Este trabalho foi realizado durante o outono, porém, como na região de Auriflama não existe diferença acentuada entre as estações do ano, e as amostras não foram coletadas durante outras estações para poder realizar a comparação, não podemos afirmar, somente sugerir, que houve influência de sazonalidade na detecção de aeróbios mesófilos nas amostras analisadas por estes motivos.

A legislação vigente não estabelece limite máximo para presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* em leite cru. Verificou-se que 53,33% das amostras de leite avaliadas estavam contaminadas por coliformes totais, 35% por coliformes termotolerantes e por *E.coli*, em número acima de 103 (tabela 1).

O que pode ser compreendido nesta situação é que segundo outros autores coliformes totais e coliformes termotolerantes são encontrados com frequência no

leite cru^{19,21,24}, principalmente devido as deficiências no controle sanitário do rebanho e na higiene do processo de obtenção do leite²⁶.

As amostras de leite colhidas nos meses de março e abril apresentaram contagens de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) superiores aos estabelecidos pela IN51 (10^6 UFC/mL). A contaminação nestes meses correspondeu a 76,6% das amostras. Brito *et al* (1998)⁸ analisaram o leite de fornecedores de um laticínio da Zona da Mata de Minas Gerais ao longo de um ano e encontraram *S. aureus* em 83,3% dos rebanhos. Nos meses de maio junho verificou-se diminuição das contagens de *S. aureus* nos animais avaliados (24,9%).

A alta incidência de *S. aureus* nas amostras de leite cru pode ser consequência, entre vários fatores, da mastite bovina, pois a bactéria é o agente mais frequentemente isolado em animais com esse tipo de enfermidade. A presença deste microrganismo no leite e derivados pode ser considerada comum, pelo fato de serem encontrados naturalmente na microbiota de animais como cabras, ovelhas e vacas³¹.

Nos meses de março e abril, no Brasil, há uma maior concentração de chuvas. Ferreira *et al.* (2006)¹⁵, relatou uma maior frequência de isolamento de *S aureus* em períodos com maior índice pluviométrico, por dificuldade de manter as condições higiênicas. Este fato pode explicar o aumento do número desta bactéria durante este período no estudo.

Em relação à *Salmonella* nenhuma amostra apresentou contaminação. Este gênero bacteriano é considerado o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo⁴¹. A ausência é um fator muito importante em razão de que surtos esporádicos de infecção por *Samonella* foram associados ao consumo de leite e derivados, sendo as causas a ingestão de leite cru, pasteurização inadequada ou contaminação

pós-processamento³.

A maior variação entre as contagens de microrganismos observou-se nas amostras de leite refrigerado coletadas no tanque de expansão (Tabela 2). Estes resultados sugerem que as práticas de higiene adotadas não garantiram uma baixa contaminação do leite cru armazenado sob refrigeração.

Tabela 2. Contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, e *Staphylococcus aureus* isolados de leite colhidos do tanque de expansão, durante o período de março a junho de 2008 em Auriflana, SP, Brasil.

| Época de colheita de leite | Média das contagens de microrganismos | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | Aeróbios mesófilos (UFC/mL) | Coliformes totais (NMP/mL) | Coliformes termotolerantes (NMP/mL) | <i>E.coli</i> (NMP/mL) | <i>Salmonella</i> (UFC/mL) | <i>S. aureus</i> (UFC/mL) |
| MARÇO | 1,9 x 10 ⁷ a | 1,4 x 10 ³ a | 1,5 x 10 ¹ a | 0,7 x 10 ¹ | Ausente | 1,6 x 10 ⁷ a |
| ABRIL | 1,5 x 10 ⁵ b | 1,0 x 10 ³ a | 0,3 x 10 ¹ a | 0,1 x 10 ¹ | Ausente | 1,2 x 10 ⁶ a |
| MAIO | 1,2 x 10 ⁴ c | 0,5 x 10 ¹ b | >0,1 x 10 ¹ a | Ausente | Ausente | 1,7 x 10 ³ b |
| JUNHO | 1,2 x 10 ³ c | 0,1 x 10 ¹ b | >0,1 x 10 ¹ a | Ausente | Ausente | 1,1 x 10 ² b |
| C.V.% | 10 | 8 | 4 | - | - | 8 |

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferenças estatísticas (p<0,05); NMP: Número Mais Provável; UFC: Unidade Formadora de Colônia.

Na amostra de leite colhida no mês de março constatou-se contagens de aeróbios mesófilos, (1,9 x 10⁷ UFC/mL), que não atendeu ao requisito microbiológico proposto pelo Ministério da agricultura a partir de 01/07/2005 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, que é de 10 x 10⁶ UFC/mL e de 7,5x 10⁵ a partir de 01/07/2008⁶. Estes resultados são superiores aos constatados por Pinto *et al.* (2006)²⁶ em amostras de leite refrigerado coletado na Zona da Mata Mineira.

A bactéria *Staphylococcus aureus* esteve presente em todas as amostras analisadas, em números que variaram de 1,1 x 10² a 1,6 x 10⁷. Nos meses de março e abril os valores encontrados ficaram acima do proposto pela IN51. Esta bactéria produz uma enterotoxina muito importante por isso à contaminação do leite deve ser a mínima possível já que é um produto destinado a alimentação, principalmente de crianças e idosos. O número mínimo de células de *S.aureus* para produzir níveis de enterotoxinas considerados suficientes para causar gastroenterite em humanos (1ng/g) parece diferir entre os alimentos e entre os tipos de enterotoxinas²¹. No

leite, as enteroxinas A e D foram detectadas em contagens de 10⁷ UFC/mL¹⁸. Esse valor é semelhante ao obtido nas amostras do mês de março nesta pesquisa, entretanto alguns autores consideram que contagens na ordem de 10⁵ – 10⁶ UFC/mL podem ter significado epidemiológico e causar intoxicação alimentar⁹. Borges *et al.* (2008)⁴ verificaram contagens elevadas de *S.aureus* em leite cru refrigerado, indicando alto potencial para produção de enterotoxinas em condições adequadas.

Todas as amostras estavam contaminadas com coliformes totais e termotolerantes em números que variaram de 1,4 x 10³ a 0,1 x 10¹ e 1,5 x 10¹ e >0,1 x 10¹, respectivamente. *Escherichia coli* foi isolada nas amostras de março e abril. Brito *et al* (2002)⁸ observou que as contagens de coliformes acima de 10³ UFC/mL, são considerados indicadores de contaminação do ambiente e de resíduos de fezes, já Murphy (1997)²³ relacionou o fato as deficiências de higiene no processo de obtenção do leite. A presença de coliformes totais e termotolerantes, assim como *E.coli* são verificados com frequência no leite cru^{10,19,21,30}.

Durante a avaliação dos resultados, notou-se um maior isolamento de microrganismos nos meses de março e abril, tanto nas amostras coletadas diretamente do teto, como das coletadas no tanque de expansão. No Brasil, de acordo com Barbieri (2005)², a estação chuvosa se inicia no final de setembro e termina no início de maio. Sugere-se então, que este aumento se deu devido a maior precipitação neste período, o que pode ser justificado pela dificuldade em manter as condições higiênicas adequadas nas instalações, animais e equipamento de ordenha.

Com relação a avaliação de formação de biofilmes nas teteiras, encontrou-se *E. coli* e *S.aureus* (fig. 1), com contagem de $1,3 \times 10^4$ e $1,75 \times 10^7$ UFC/cm², respectivamente. Desta forma, é possível afirmar, comparativamente a outros trabalhos, que ocorreu um processo de formação de biofilme. Wirtanen *et al* (1996)⁴⁰ e Ronner & Wong (1993)³² consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^3 e 10^5 por cm², respectivamente. No entanto, se compararmos ao estudo realizado por Andrade *et al.* (1998)¹ apenas houve formação de biofilme por *S aureus*, pois eles consideram que é necessário no mínimo 10^7 células aderidas por cm² para caracterizar um biofilme.

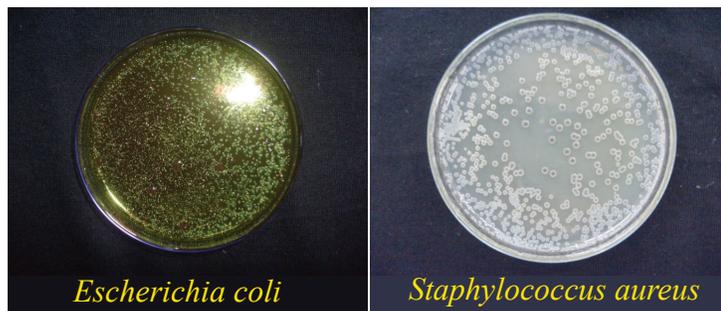


Figura 3: Colônias de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de teteiras

A qualidade microbiológica do leite cru é um fator muito importante a ser considerado e depende da saúde da glândula mamária, das condições de manejo do rebanho, da higiene na obtenção do leite e da sala de ordenha, equipamentos e utensílios usados, do estado de saúde do ordenhador e das condições de estocagem^{1,16,17}. Se estes parâmetros não forem considerados e não houver a realização das normas de boas práticas de produção, a população bacteriana irá aumentar e este aumento é indesejável para o consumidor, pois coloca em risco a saúde do mesmo devido à maior probabilidade de veiculação de doenças, muitas vezes de alta patogenicidade e para a indústria, devido a problemas na estocagem e no

processamento do leite, além de características sensoriais indesejáveis^{12,22,27}.

A maioria dos países já tem consciência da importância da qualidade do leite. Nos Estados Unidos, por exemplo, os parâmetros exigidos são de 100 mil microrganismos por ml, e existem cidades que as normas são ainda mais exigentes, como por exemplo, na Califórnia, onde os níveis não podem ultrapassar 50 mil microrganismos por ml. O Japão, a Coreia do Sul, Formosa e Tailândia já estão se empenhando para melhorar seu produto, enquanto outros países exportadores estão se adequando aos padrões europeus que exigem a comercialização de um produto de melhor qualidade³⁷.

Conclusões

Baseado nos resultados encontrados chegamos as seguintes conclusões:

1. O leite deve ser obtido da maneira mais higiênica possível, pois se o mesmo chegar ao tanque de expansão com um alto número de bactérias, mesmo após a refrigeração, este número continuará elevado e a qualidade do produto será inferior.
2. O aumento do índice pluviométrico em uma região tende a aumentar o número de microrganismos isolados dos diversos gêneros estudados.
3. Deve ser implementado programas eficientes de controle de mastite na propriedade, já que grande quantidade de patógenos causadores da enfermidade foram isolados no leite cru in natura e refrigerado, sugerindo a ocorrência de mastite subclínica no rebanho.
4. Implantação da realização do CMT (Califórnia Mastitis tests) visando a detecção de mastite subclínica para descarte dos animais positivos e com isso a eliminação de potenciais fontes de contaminação do rebanho.
5. Programas eficientes de higiene de equipamentos devem ser implementados através de correta limpeza e utilização de produtos adequados visando a eliminação dos biofilmes.

Referências

1. Andrade NJ, Bridgeman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. Journal of Food Protection, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

2. Barbieri PRB. Caracterização da estação chuvosa nas regiões sul e sudeste do Brasil associado com a circulação atmosférica. São José dos Campos, 2005, 121p. Dissertação (Mestre em Meteorologia), Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).
3. Boor KJ. Pathogenic microorganisms of concern to dairy industry. Dairy Food Environmental Sanitary, v.17, p.714-717, 1997.
4. Borges MF, Arcuri EF, Pereira JL, Feitosa T, Kuaye AY. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: Revisão. Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos, v. 26, n.1, p.71-86, 2008.
5. Brasil. Decreto n.30.691 de 29 de março de 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 jul. 1952, 123p.
6. Brasil. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B e Tipo C e Cru Refrigerado. Diário oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2002, Seção 1, p. 13-22.
7. Brasil. EMPRESA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA – EMBRAPA. Estatísticas do leite: produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil. Disponível em: < <http://www.cnpqi.embrapa.br/>>. Acesso: 17 abril 2012.
8. Brito MAPV, Brito JRF, Souza HM. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para o isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.18, p.39-44, 1998.
9. Carmo LS, Dis RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, Pena C, Jett M, Heneine LG. Food poisoning due to enterotoxigenic strains present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiology, v.19, p.9-14, 2002.
10. Catão RMR, Ceballos BSO. *Listeria* spp, Coliformes totais e fecais e *Escherichia coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.21, n.3, p.281-287, 2001.
11. Cerqueira MMOP, Sena MJ, Souza MR, Leite MO, Silva NA, Moraes CFA. Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.54, n.309, p.251-254, 1999.
12. Costa LCG, Carvalho EPD, Carvalho ASD. Aspectos higiênicos do leite na fonte de produção, no Município de Lavras, MG. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.38, n.230, p.43-46, 1983.
13. Fagan EP, Tamanini R, Fagnani R, Beloti V, Barros MAF, Jobim CC. Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. Semina Ciências Agrárias, v.29, n.3, p.651-660, 2008.
14. Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. Ciência Rural, v.34, n.4, p. 1315-1320, 2004.
15. Ferreira LM, Nader FILHO A, Oliveira E, Zafalon LF, Souza V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite subclínica bovina. Ciência Rural, v.36, p. 1228-1234, 2006.
16. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos editorial, 2000.
17. Holm C, Mathiasen T, Jespersen LA. flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. Journal of Applied Microbiology, v.97, p.935-941, 2004.
18. Jay JM. Microbiologia de alimentos, 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.
19. Lange CC, Portugal JAB, Anna APS, Abreu ANI, Brito MAVP, Souza GN. Avaliação da contagem de bactérias mesófila e psicrotófica no leite cru estocado a 4° C por 48h. Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”, v.61, n.351, p185 - 187, 2006.
20. Macedo REF, Júnior Sergio BP. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado do tipo C, comercializado na região metropolitana de Curitiba, PR. Revista Higiene Alimentar, n.128. p.103-104, 2005.

21. Maciel JF, Carvalho EA, Santos LS, Araujo JB, Nunes VS. Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetininga-BA. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.9, n.3, p. 443-448, 2008.
22. Mendonça AH. Qualidade físico-química de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. *Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes*, v.56, n.321, p.276-281, 2001.
23. Murphy S. Raw milk bacteria tests: Standard plate counts, preliminary incubation counts, lab pasteurized count, and coliform count. What do they mean for your farm? In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING. 1997. Syracuse: Proceedings, p.34-42.
24. Nero LA, Matos MR, Beloti V, Barros MAF, Netto DP, Pinto JPAN, Andrade NJ, Silva WP, Franco BDGM. Hazard in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, n.3, p.211-215, 2004.
25. Ordóñez JÁ, Rodriguez MIC, Sanz MLG, Minguillón GDGF, Perales LH, Cortecero MDS. Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. v.2. p.41.
26. Padilha MRF, Fernandes ZF, Leal ACA, Leal NC, Almeida AP. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, n.2, p.167-171, 2001.
27. Picinin LCA. Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais. Minas Gerais, 2003, 89p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
28. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas prteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.3, p.645-651, 2006.
29. Prata LF. Fundamentos da Ciência do leite. São Paulo: Unesp, 1998.
30. Ramos MPP, Furtado MM, Ribeiro Junior JIR, Muller ES, Souza JG, Ladeira SA. Avaliação microbiológica do leite cru a granel e pasteurizado na região de Viçosa, MG. *Revista do Instituto de Laticínios "Candido Tostes"*, v.57, n.327, p170 - 174, 2002.
31. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Bsser TE. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, n.12, p. 3.217-3.219, 1992.
32. Ronner AB, Wong ACL. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. *Journal of Food Protection*, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.
33. Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C, Richard N. Enterotoxin production by *Staphylococcus* isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, v.35, p.213-221, 1997.
34. Ruiz RL. Microbiologia zootécnica. São Paulo: Roca, 1992. p.215-239.
35. Santana EHW, Beloti V, Barros MAF, Nero LA, Moraes LB, Gusmão VV, Pereira MS, Fagan EP. Principais pontos de contaminação do leite na produção e beneficiamento. *Revista Higiene Alimentar*, n.82. p.74, 2001.
36. Santos D, Bergmann GP. Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite cru. *Revista Higiene Alimentar*, n.109. p.70, 2003.
37. Sincal. Associação Nacional dos Sindicatos Rurais das Regiões Produtoras de Café e Leite. Ações que definem a qualidade do leite e derivados. 2009. Disponível em: http://sincal.org.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=20:acoes-que-definem-a-qualidade-do-leite-e-derivados&catid=22:leite-artigos&Itemid=39. Acesso em: 04 maio 2012.
38. Vieira MCM, André M CDPB, Serafine AB, Lima SV, Silva EV. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no estado de Goiás no período de janeiro a junho de 2000. *Revista Higiene Alimentar*, n.82. p.72, 2001.

39. Vilela D, Leite JLB, Resende JC. Políticas para o leite no Brasil: passado, presente e futuro. In: Santos, G. T.; Jobim, C. C.; Damasceno, J.C. Sul-leite Simpósio sobre sustentabilidade da Pecuária Leiteira da Região sul do Brasil, 2002. Anais. Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.
40. Wirtanen G, Husmark U, Mattila-Sandholm T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.
41. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Drug-resistant *Salmonella*. Fact Sheet no 139. Revised april 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso em 20/05/2007.