

IVANA APARECIDA DA SILVEIRA

**ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO LEITE TIPO B CRU CONSERVADO
SOB REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientadora
Eliana Pinheiro de Carvalho**

**LAVRAS - MINAS GERAIS - BRASIL
1997**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da Biblioteca Central da UFLA

Silveira, Ivana Aparecida da

Estudo microbiológico do leite tipo B cru conservado sob refrigeração/ Ivana Aparecida da Silveira.

-- Lavras : UFLA, 1997.

84 p. : il.

Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho

‡ Dissertação (Mestrado) - UFLA

Bibliografia.

1. Leite - Conservação. 2. Leite refrigerado. 3. Lipólise. 4. Proteólise.
5. Microrganismos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDC-637. 1272

IVANA APARECIDA DA SILVEIRA

**ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO LEITE TIPO B CRU CONSERVADO
SOB REFRIGERAÇÃO**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Pós-graduação em
Ciências dos Alimentos, para obtenção do
título de “Mestre”.**

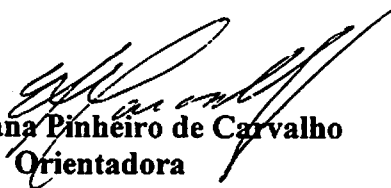
APROVADA em 13 DE JUNHO de 1997.



Prof.^a Rosane F. Schwan



Prof. Luiz Ronaldo de Abreu



**Prof.^a Eliana Pinheiro de Carvalho
Orientadora**

Ao Wagner,
presença, amor, apoio, incentivo e companherismo constante

Ao meu pequeno Luiz Augusto,
luz e vida

Aos meus pais, Tarcílio e Rosa,
pela oportunidade da vida, pelo amor, dedicação e incentivo à carreira

Aos meus irmãos e irmãs,
pelo apoio e amor

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela paz e presença constante nesta jornada.

À professora Eliana Pinheiro de Carvalho, pela orientação, amizade, incentivo, conselhos “maternais”, apoio, oportunidades oferecidas e mais do que nunca, por ter acreditado em mim.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras e todos seus professores e funcionários, pela oportunidade e ajuda.

À CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pela co-orientação, amizade, apoio e incentivo.

À professora Vânia Déa de Carvalho, pela amizade, carinho, capacidade intelectual e espiritual.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia, Eliana Mara Alcântara e Cipriano Porfírio da Silva (Sr. Piano), pela amizade, dedicação e auxílio prático.

Às laboratoristas Sandra e Tina, pela ajuda imprescindível na execução das análises físico-químicas.

Ao chefe do Departamento, professor Paulo Clemente e a secretária Gicelda, pela disponibilidade e informações.

À monitora Damaris Teixeira, pela preciosa ajuda, incentivo e presença durante toda a fase experimental.

Às amigas Kelly Cristina, Débora Leal, Luciane Cunha, Lucimeire Pilon, Elizângela Santos e Elaine Souza, pela ajuda, amizade, carinho e alegria.

Às amigas Cláudia Sartorelli e Ana Hortência Fonseca de Castro, pela amizade incondicional, companherismo, cumplicidade e paciência nos momentos difíceis.

As amigas, Anna Cristinna Moura, Ana Cláudia, Gaby Patrícia e aos outros amigos e colegas da pós-graduação, pela amizade sincera e excelente convívio.

Ao meu irmão, Jorge Luis, pelo exemplo de vida.

Aos amigos Ivan Cordeiro e Noilce pela paciência, hospitalidade e carinho.

Aos amigos Luiz Cordeiro e Heloísa pela aceitação e incentivo.

A sra. Zirza Lopes Cordeiro pela fé, carinho e aceitação.

Aos amigos Estela e Matuzalém, pelo apoio, amizade e incentivo.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho,

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1 Aspectos gerais da conservação do leite à baixas temperaturas.....	4
2 O processamento térmico e os microrganismos.....	6
3 Os microrganismos e seus produtos metabólicos em leite.....	8
Referências bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 1.....	17
Estudo da conservação do leite tipo B cru sob refrigeração.....	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1.2.1 Coleta das amostras.....	22
1.2.2 Tratamento das amostras.....	23
1.2.3 Análises microbiológicas.....	23
1.2.3.1 Contagem total.....	24
1.2.3.2 Verificação da atividade proteolítica e lipolítica.....	24
1.2.3.3 Coloração de esporos.....	24
1.2.4 Análises físico-químicas.....	25
1.2.4.1 Acidez.....	25
1.2.4.2 Gordura.....	25
1.2.4.3 pH.....	25
1.2.4.4 Ácidos graxos livres.....	25
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
1.3.1 Condições físico-químicas.....	26
1.3.2 Condições microbiológicas.....	27
1.3.2.1 Aspectos gerais da qualidade microbiológica do leite tipo B cru.....	27
1.3.2.2 Avaliação da flora microbiana do leite.....	28
1.3.2.2.1 Avaliação dos microrganismos psicrotróficos.....	28
1.3.2.2.2 Avaliação dos microrganismos mesófilos.....	28

1.3.2.2.3 Avaliação dos microrganismos termófilos.....	29
1.3.2.3 Caracterização dos grupo de microrganismos.....	31
1.3.2.3.1 Avaliação dos microrganismos psicrotróficos.....	31
1.3.2.3.2 Avaliação dos microrganismos mesófilos.....	32
1.3.2.3.3 Avaliação dos microrganismos termófilos.....	32
1.3.2.4 Avaliação das atividades proteolíticas e lipolíticas dos grupos estudados.....	33
1.4 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPITULO 2.....	42
Efeito da aplicação de tratamento térmico em leite tipo B cru a ser refrigerado.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
2.1 INTRODUÇÃO.....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.2.1 Coleta da amostra.....	47
2.2.2 Tratamento da amostra.....	47
2.2.3 Análises microbiológicas.....	48
2.2.3.1 Contagem total.....	49
2.2.3.2 Verificação das atividades proteolíticas e lipolíticas.....	49
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.3.1 Aspectos gerais da qualidade microbiológica do leite aquecido.....	50
2.3.2 Grupos microbianos isolados.....	52
2.3.3 Avaliação das propriedades lipolíticas e proteolíticas.....	54
2.4 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
CAPÍTULO 3.....	61
Microrganismos em leite tipo B cru e aquecido, estocado sob refrigeração.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
3.1 INTRODUÇÃO.....	64
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3.2.1 Coleta e tratamento das amostras.....	66
3.2.2 Meio de cultura empregado.....	67
3.2.3 Obtenção e isolamento das colônias.....	67
3.2.4 Purificação das colônias isoladas.....	67
3.2.5 Preservação das colônias isoladas.....	67
3.2.6 Caracterização preliminar das colônias.....	68
3.2.7 Identificação dos microrganismos.....	68
3.2.7.1 Cocos Gram positivos, catalase positiva.....	69
3.2.7.2 Cocos Gram positivos, catalase e oxidase negativas.....	69
3.2.7.3 Bacilos Gram positivos formadores de esporos.....	69
3.2.7.4 Bacilos Gram positivos não formadores de esporos.....	70
3.2.7.5 Bacilos Gram negativos catalase positiva, oxidase positiva.....	70
3.2.7.6-Bacilos Gram negativos catalase positiva, oxidase negativa.....	70

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.3.1 Estudo da flora do leite cru e aquecido à 80 ^o C.....	72
3.3.2 Caracterização dos microrganismos Gram negativos.....	72
3.3.3 Caracterização da flora Gram positiva.....	74
3.3.3.1 Identificação dos bacilos Gram positivos.....	74
3.3.3.2 Identificação dos cocos Gram positivos.....	76
3.3.4 Aspectos gerais sobre a microbiota identificada nos leites cru e aquecido.....	77
3.3.4.1 Microrganismos isolados no leite cru.....	77
3.3.4.2 Microrganismos isolados no leite aquecido.....	79
3.4 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
	CAPÍTULO I	
1.1	Valores obtidos nas determinações de acidez, pH, gordura e ácidos graxos livres em leite tipo B cru refrigerado nos diferentes dias de estocagem.....	26
1.2	Contagens totais de microrganismos mesófilos realizadas em controle diário e na usina de beneficiamento em São Paulo.....	28
1.3	Números e porcentagem dos grupos microbianos isolados do leite cru tipo B refrigerado.....	31
	CAPÍTULO 2	
2.1	Porcentagem do número de microrganismos psicrotróficos, mesófilos e termófilos isolados no leite aquecido.....	53
	CAPÍTULO 3	
3.1	Relação dos microrganismos isolados de acordo com a temperatura de incubação e características preliminares.....	71
3.2	Bacilos Gram negativos isolados do leite cru e aquecido.....	73
3.3	Bacilos Gram positivos isolados nos leites cru e aquecido.....	75
3.4	Cocos Gram positivos isolados nos leites cru e aquecido.....	76
3.5	Número e porcentagem de bactérias psicrotróficas, mesófilas e termófilas isoladas no leite cru.....	78
3.6	Número e porcentagem de bactérias psicrotróficas, mesófilas e termófilas isoladas no leite aquecido.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
	CAPÍTULO 1	
1.1	Esquema experimental.....	22
1.2	Esquema das análises no leite cru.....	23
1.3	Log do número de microrganismos isolados do leite B em diferentes dias de estocagem.....	27
1.4	Relação em porcentagem da atividade proteolítica e lipolítica dos microrganismos psicrotróficos isolados no leite cru.....	33
1.5	Relação em porcentagem da atividade proteolítica e lipolítica dos microrganismos mesófilos isolados no leite cru.....	34
1.6	Relação em porcentagem da atividade proteolítica e lipolítica dos microrganismos termófilos isolados no leite cru.....	36
1.7	Verificação da reação de proteólise: halos apresentados pelos microrganismos em ágar leite desnatado.....	37
1.8	Verificação da reação de lipólise: halos apresentados pelos microrganismos em ágar tributirina.....	37
	CAPÍTULO 2	
2.1	Esquema das análises no leite aquecido.....	48
2.2	Log do número de microrganismos isolados no leite aquecido.....	50
2.3	Porcentagem do número de microrganismos psicrotróficos envolvidos em atividades proteolíticas e lipolíticas no leite aquecido.....	55
2.4	Porcentagem do número de microrganismos mesófilos envolvidos em atividades proteolíticas e lipolíticas no leite aquecido.....	55
2.5	Porcentagem do número de microrganismos termófilos envolvidos em atividades proteolíticas e lipolíticas no leite aquecido.....	56
2.6	Verificação da reação de proteólise: halos apresentados pelos microrganismos em ágar leite desnatado.....	57
2.7	Verificação da reação de lipólise: halos apresentados pelos microrganismos em ágar tributirina	57
	CAPÍTULO 3	
3.1	Esquema seguido para identificação dos microrganismos em estudo.....	68

I INTRODUÇÃO

A qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, onde fatores de ordem social, econômica, cultural e até mesmo climática estão envolvidos, e que não tem merecido a devida atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população.

O leite por ser considerado um alimento completo em nutrientes, nutrientes estes facilmente assimiláveis, torna-se um excelente alimento para o homem e um meio de cultura para a maioria dos microrganismos encontrados na natureza.

A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento. Em geral, quanto maior o número de contaminantes e quanto mais alta for a temperatura na qual o leite permanece (próxima de 30°C), menor será o seu tempo de conservação.

Existe um grande interesse por parte dos pesquisadores, em encontrar soluções para a melhoria da manutenção da qualidade do leite esterilizado, pasteurizado e de seus produtos.

A carga microbiológica do leite cru é de extrema importância na qualidade final de produtos lácteos. Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, devido a sua contaminação principalmente pelas bactérias psicrotróficas formadoras ou não de esporos, que apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas (lipases e proteases) que rapidamente alteram o produto (Bishop e White, 1988; Craven e Macauley, 1993).

Na indústria de queijos, os produtores tem sérios problemas com relação ao rendimento dos mesmos, devido a atuação de bactérias, principalmente psicrotróficas, sobre a proteína do leite. Também os microrganismos utilizam em seu metabolismo outros componentes do leite,

podendo produzir produtos metabólicos de sabores e odores estranhos, assim como enzimas termoestáveis que vão trazer ao alimento alterações indesejáveis. Ravanis e Lewis (1995) afirmam que mesmo em produtos finais que tenham uma contagem bacteriana dentro dos padrões legais, este tipo de transformação pode ocorrer.

A corrente prática de estocagem do leite cru à 4 - 7°C por 3 a 4 dias antes do processamento, permite o crescimento de bactérias psicrófilas. Este armazenamento do leite em temperaturas de refrigeração tem resultado em novos problemas de qualidade para a indústria.

No que se refere ao grupo psicrófilo, a maioria das bactérias presentes em produtos lácteos são bacilos pequenos, Gram negativos, não esporulados, oxidase positivas, geralmente dos gêneros: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes*. Em quase todos os leites pasteurizados e sub produtos, a maioria dos defeitos são produzidos devido a esse grupo de bactérias e suas enzimas.

Os microrganismos esporulados dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* tem também alcançado um considerável interesse nos últimos anos, principalmente por serem termofílicos. Quando a competição entre as bactérias psicrófilas mais freqüentes não existe ou é mínima, estes esporulados podem se desenvolver durante os períodos de refrigeração, causando defeitos como a coagulação doce e o sabor amargo.

Considerando-se o importante papel que os microrganismos desempenham com relação à qualidade e conservação do leite e seus derivados, torna-se de grande interesse o conhecimento mais detalhado desses grupos e/ou gêneros de microrganismos comumente envolvidos de forma benéfica, como aqueles responsáveis por fermentações indispensáveis na fabricação de vários produtos, ou de forma maléfica, causando defeitos e deteriorações das mais diversas.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo, verificar a presença de microrganismos, em leite cru tipo B refrigerado, em diferentes tempos de estocagem. Também verificou-se a qualidade do leite B entregue em uma usina de beneficiamento local, isolando e identificando os microrganismos esporulados e os psicrófilos existentes nas amostras coletadas. A capacidade dos microrganismos isolados produzirem proteólise e/ou lipólise no leite foi também estudada.

II Revisão de Literatura

A qualidade do leite está associada, de uma forma geral, com a carga microbiana presente no produto (Mutukumira et al, 1996). No Brasil, o leite “in natura” apresenta baixa qualidade, sendo que este fator está relacionado com a influência das estações do ano, as práticas de produção e manuseio a nível de fazenda, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e a distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria, que contribuem para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes do leite (Huhn et al, 1980).

Fatores como a qualidade bacteriológica das águas, qualidade do ar dos estábulos, sanidade dos ordenhadores e dos animais e, principalmente, utensílios não perfeitamente higienizados também contribuem, de modo decisivo, no estado microbiológico do leite.

· Diversos microrganismos contaminam o leite durante e após a ordenha. Muitos deles crescem rapidamente à temperatura ambiente, desse modo, quanto maior o período em que o leite for mantido nessas condições, maiores as alterações na qualidade do produto (Wolfschoon-Pombo, 1984).

O leite recém-ordenhado é relativamente resistente a ação dos microrganismos, devido a presença de inibidores microbianos naturais, como as lacteninas, presentes em tres frações, denominadas lactenina 1, 2 e 3. A lactenina 1 está presente no colostro e a lactenina 2, no leite até uma hora após a ordenha e constitui o sistema lactoperoxidase-tiocianato-peróxido de hidrogênio (Alais, 1991). A ação inibidora de ambas é bacteriostática.

Reiter e Harnulv (1984) sugeriram o sistema lactoperoxidase (LP) como um possível meio de manter a qualidade do leite mantido nas fazendas à temperatura ambiente, e durante subsequente estocagem. O sistema LP do leite bovino é relativamente termorresistente; apesar da enzima ser parcialmente inativada pela pasteurização em curto tempo à 74°C, seus resíduos permanecem suficientemente ativos para catalizar a reação entre o tiocianeto (SCN) e o peróxido

de hidrogênio. Dos produtos dessa reação, o mais investigado é o hipotiocianeto (OSCN^-). Esse produto é responsável pela inibição do crescimento bacteriano no leite e foi sugerido que o máximo de concentração dele no leite está por volta do terceiro ou quarto dia (Ravanis e Lewis, 1995). Microrganismos Gram negativos, catalase positiva, como *Pseudomonas sp*, coliformes, *Salmonella sp* e *Shigella sp* são inibidos pelo sistema LP; assim o sistema LP pode aumentar o tempo de armazenamento do leite cru retardando o crescimento de microrganismos psicotróficos (Wolfson e Summer, 1993).

1 Aspectos gerais da conservação do leite à baixas temperaturas

O armazenamento do leite por longos períodos em temperaturas de refrigeração tem resultado em novos problemas de qualidade para a indústria de laticínios. Estes problemas estão relacionados ao crescimento e às atividades metabólicas de microrganismos em baixas temperaturas (Robinson, 1987).

Gounot (1986) e Silva (1991) observaram que os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura. Essa flora inclui, além dos mesófilos, microrganismos termófilos e psicotróficos.

Os mesófilos constituem um grupo importante por incluir a maioria dos microrganismos acidificantes, e por se desenvolverem à temperaturas entre 20 e 45°C, com a temperatura ótima de crescimento em torno de 30 a 40°C (Jay, 1994). Esses microrganismos também são importantes devido a termorresistência apresentada por vários gêneros.

As bactérias termófilas são definidas como aquelas cuja temperatura ótima de crescimento situa-se entre 55-65°C, como máximo, para algumas espécies, podendo atingir 75-90°C e o mínimo em torno de 35°C (ICMSF, 1980). O leite cru normalmente contém poucas bactérias termófilas, embora em número suficiente para se desenvolverem no leite mantido à temperaturas elevadas, acarretando grande número desses microrganismos no produto. Essas bactérias constituem problema no leite pasteurizado quando algumas porções são mantidas, por algum tempo, entre 50-70°C.

O termo psicotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo do século. Outros termos sinônimos são usados, tais como: psicrófilos, psicrófilos facultativos, tolerantes ao frio ou psicrotolerantes (Gounot, 1986).

2 O processamento térmico e os microrganismos

Segundo Patel, Bartlett e Hamid (1983) são encontrados número reduzidos de microrganismos, principalmente psicrotróficos, sobreviventes em leites pasteurizados e esterilizados. Eles afirmam que o leite pasteurizado tem que ser estocado à 7°C por uma semana, antes dos psicrotróficos resistentes ao calor poderem ser detectados (tempo necessário para o reparo das células danificadas).

A esterilização pelo calor é um processo bem conhecido e amplamente usado. O termo esterilização implica numa destruição absoluta de todos os microrganismos e, desde que esta condição não possa ser atingida em alguns alimentos processados, a expressão “esterilização comercial” tem sido empregada (Brown, 1994). O uso da expressão “leite esterilizado” na indústria láctea não implica que o leite seja necessariamente estéril (Higginbottom e Taylor, 1960). Os mesmos autores demonstraram que o leite esterilizado contém de 0 a 5 esporos por 100 ml. do produto.

A esterilização comercial dos produtos lácteos é um meio de que se dispõe para prolongar a vida útil com ou sem refrigeração (Romero, 1988). Altas temperaturas são necessárias para destruir os esporos bacterianos, enquanto as células vegetativas são destruídas em temperaturas mais baixas (Schroder e Bland, 1984). Os microrganismos esporogênicos são bactérias que podem contaminar o leite durante a produção na fazenda e sobreviver ao tratamento térmico, durante o processamento (Theilmann, 1995).

Segundo Mikolajcik e Simon (1978) o leite cru de média qualidade microbiana tratado à 80°C por 12 minutos ainda contém microrganismos viáveis após o tratamento térmico. O autor afirma que certamente esses microrganismos são formadores de esporos e que as estruturas sobreviventes ao tratamento térmico seriam esses esporos.

Estudos realizados por Meer et al (1993) revelaram que a flora microbiana do leite tratado termicamente e estocado sob refrigeração consistia de 83% de *Bacillus*, indicando que os microrganismos mais resistentes são bactérias aeróbias ou facultativas, formadoras de esporos. Os dados confirmam a importância do grupo de microrganismos denominado termodúrico, que não é caracterizado pela temperatura de crescimento, mas sim pela sua resistência térmica, pois são capazes de sobreviverem ao tratamento térmico comumente utilizado na pasteurização do leite, ou seja, 72°C por 15 segundos ou 63°C por 30 minutos. Assim sendo, a grande importância desse

grupo pode ser avaliada na conservação de produtos pasteurizados, e ainda mais porque espécies desse grupo tem sido encontradas entre os psicrotróficos.

Johnston e Bruce (1982) mencionaram que a contagem de esporos em amostras de leite pasteurizado pode ser maior do que em amostras de leite cru. Isto pode ser devido também a contaminação com esporos do equipamento, em virtude das falhas de higienização nas usinas. As bactérias esporogênicas estão presentes usualmente em pequeno número, quando o leite é ordenhado em boas condições sanitárias.

Parece não existir correlação entre o número total de bactérias e o de esporos, embora um número elevado de esporos esteja geralmente associado a uma população elevada de bactérias (Phillips e Griffiths, 1986).

Segundo Martin (1981), um estudo para determinar espécies esporogênicas no leite, em países onde prevalece uma temperatura média alta, demonstrou que as mesmas espécies de microrganismos esporogênicos estão presentes, sendo os mais comuns: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, e *B. cereus*. Crielly, Logan e Anderton (1994) citam que a incidência de *B. cereus* é maior no período de verão, ao passo que *B. licheniformis* é mais comum no período de inverno.

Segundo Westhoff e Dougherty (1981), *B. subtilis* tem sido isolado mais frequentemente em leite esterilizado, enquanto que o *B. licheniformis* é mais frequente no leite cru tratado termicamente (Crielly, Logan e Anderton, 1994).

Sutherland (1993) demonstrou que *B. cereus* é a bactéria esporogênica mais importante na alteração do leite pasteurizado, estocado em temperaturas de 6 a 20°C. *B. cereus* é capaz de crescer na faixa psicrotrófica sendo responsável por doenças do tipo alimentar (Sutherland e Limond, 1993; Granum, 1994). Este bacilo, largamente distribuído na natureza, tem sido isolado de uma grande variedade de alimentos, estando envolvido em surtos de intoxicação alimentar, como agente etiológico de gastroenterites humanas e produtor de toxinas (Larsen e Jorgensen, 1997).

Chopra e Mathur (1984) demonstraram que apenas 6 das 25 estirpes de *B. cereus*, isoladas no leite, são patogênicas. Segundo Johnston e Bruce (1982), é provável que estirpes de *B. cereus*, presentes no leite, formem um grupo distinto, ou seja, não originárias do mesmo.

3 Os microrganismos e seus produtos metabólicos em leite

A flora psicrotrófica do leite é responsável pela produção de enzimas, e os processos de pasteurização do leite eliminam a maioria dos microrganismos inicialmente presentes no leite cru. Existe porém, a possibilidade de sobrevivência de microrganismos ou de enzimas produzidas por eles no leite pasteurizado. Existe também a possibilidade de uma recontaminação por essas bactérias durante as fases de processamento do leite (Gomes, 1988).

Griffiths (1990) relata a predominância em leite, de bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos e catalase positiva; muitos desses associados com a proteólise e lipólise em leites e derivados. Segundo Schroder e Bland (1984), essas bactérias Gram negativas, responsáveis por grande parte dos defeitos do leite refrigerado são eliminadas na pasteurização. Bactérias do gênero *Pseudomonas* podem ser destruídas pela pasteurização quando presentes em baixos números (10^2 UFC/ml), mas podem sobreviver quando acima de 10^6 UFC/ml.

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 (Collins, 1981).

O efeito da temperatura de crescimento na síntese de proteases e lipases extracelulares por psicrotóxicos em leite é dependente da espécie (Griffiths, 1990). Almeida e Furtado Filho (1993) citam um estudo da atividade proteolítica de 154 espécies de microrganismos isolados de leite cru, submetidos a crescimento em leite desnatado e caseína, à 5, 20 e 30°C. Espécies de *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Alcaligenes*, todos Gram negativos, mostraram atividade proteolítica à 5°C.

O ambiente também influencia na produção de proteases; a temperatura ótima de crescimento de *Pseudomonas* é 20°C em pH neutro, porém a produção de proteases, frequentemente aumenta, com a redução da temperatura. Várias espécies de *Pseudomonas*, quando presentes, no leite cru, em números como 10^6 UFC/ml, produzem metaloproteases neutras, extracelulares e termorresistentes, acarretando sérios problemas após o processamento (Fairbairn e Law, 1986).

Os psicotróficos, de modo geral, produzem enzimas que não são completamente inativadas pelo processamento UHT. Esse grupo representa menos de 10% da flora inicial do leite cru, porém, como são capazes de crescer rapidamente durante a permanência do leite cru sob refrigeração, passam a constituir o grupo dominante. O gênero mais comum, encontrado no leite são *Pseudomonas sp*, particularmente *Pseudomonas fluorescens*. Outros microrganismos psicotróficos incluem *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*. As proteases produzidas pelos psicotróficos podem, mesmo em baixas concentrações, hidrolisar as proteínas do leite causando sabor amargo e gelificação na armazenagem do leite UHT (Gomes,1996).

Adams, Barach e Speck (1975) demonstraram que a susceptibilidade do leite UHT à ação de enzimas proteolíticas aumentava com o tempo de estocagem do leite cru. Mottar citado por Gomes (1996) também verificou a influência dessas enzimas nas modificações do leite UHT armazenado. 97% das amostras analisadas continham proteases termorresistentes que não foram completamente inativadas depois do tratamento UHT. A qualidade microbiana do leite cru, mais particularmente, a quantidade de psicotróficos, determina a natureza e a quantidade dessas enzimas termorresistentes.

O leite pasteurizado parece ser mais resistente à proteólise do que o leite UHT. O uso de altas temperaturas durante o processamento pode levar a exposição de novos sítios moleculares das proteínas à ação das proteases (McKellar, 1981).

Kohlmann, Nielsen e Ladisch (1991) purificaram proteases extracelulares produzidas por *Pseudomonas fluorescens* e observaram sua resistência à pasteurização e ao tratamento UHT.

Como essas proteases são capazes de resistir à tratamentos severos como a esterilização e ao congelamento, o desenvolvimento do sabor amargo ocorrerá durante a estocagem do leite esterilizado UHT devido a ação dessas proteases termorresistentes sobre a k-caseína (Almeida e Furtado Filho, 1993).

Os microrganismos psicotróficos, como *Bacillus sp*, por produzirem esporos resistentes ao calor, podem causar problemas organolépticos no leite UHT, interferindo em sua qualidade a armazenagem (22^oC - 37^oC), principalmente pelo desenvolvimento de rancificação, uma vez que produzem também lipases termorresistentes (Adhikari e Singhal, 1992).

Há que se considerar a resistência térmica dessas enzimas proteolíticas e lipolíticas. De acordo com Zall e Chan (1981), as bactérias psicotróficas podem produzir lipases e proteases que não são destruídas pelos métodos convencionais de pasteurização. Adams (1975) estudou a

resistência térmica de proteases extracelulares produzidas por *Pseudomonas*. A destruição de 90% da protease pode ser atingida à 72^oC por 4 a 5 horas; tratamento este considerado altamente prejudicial ao leite. Observou também que, *Pseudomonas fluorescens* produz protease que requer 7 minutos à 120^oC para perder 90% da atividade.

Griffiths, Phillips e Muir (1981), isolando bactérias psicrotróficas de produtos de laticínios, observaram a resistência térmica de suas proteases e lipases ao tratamento de 77^oC por 17 segundos e 140^oC por 5 segundos.

A lipólise resulta da ação de lipases (naturais e/ou microbianas), enzimas que tem a propriedade de hidrolisar os triglicerídeos da gordura, liberando os ácidos graxos de cadeia curta (butírico, caprótico, caprílico e cáprico), que são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. A lipase natural, presente no leite, é uma enzima termosensível, facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos à matéria graxa de um leite manuseado e processado adequadamente. Entretanto as lipases microbianas podem causar alterações na gordura do leite após o processamento térmico, uma vez que são resistentes à temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas (Gomes, 1988).

Ternstron, Lindberg e Molin (1993) citam que a atividade lipolítica dos microrganismos psicrotróficos é de grande importância em laticínios. *Pseudomonas fragi* é evidenciada como lipolítica, quando crescem em baixas temperaturas. Os autores destacam ainda as diferentes temperaturas e pH, onde a ação da lipase é considerada ótima e, a especificidade pelos triglicerídeos, que também difere entre as lipases produzidas pelos psicrotróficos.

Segundo Pinheiro, Liska e Parmelee (1965) existem diferenças entre a estabilidade térmica da lipase produzida por *Pseudomonas sp.* Foi demonstrado que a enzima produzida por *Pseudomonas fluorescens* foi inativada, utilizando-se pasteurização lenta aplicada ao leite comercial. Entretanto, as enzimas produzidas por *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas mucidolens* foram mais estáveis ao tratamento térmico, causando problemas em queijo suíço em função dos defeitos desenvolvidos pela ação da enzima.

Lipases resistentes de 23 espécies de *Pseudomonas sp.* foram estudadas. A enzima de 7 dessas culturas produziram ligeira rancificação em leite pasteurizado no segundo dia de estocagem. A maior parte das culturas produziu rancidez (medida pelo aumento de acidez na gordura livre e mudanças no sabor e aroma) depois de 8 dias de estocagem (Overcast, 1968).

De acordo com Kason, Pavamani e Nakai (1972), a lipólise em leite pasteurizado é intensificada durante a estocagem em refrigerador, podendo ser medidos os valores de lipólise através dos ácidos graxos livres e contagem bacteriana.

Gillis et al (1985) investigaram a presença de enzimas termorresistentes e microrganismos no leite UHT e sua influência nas mudanças sensoriais durante a estocagem com redução da qualidade e por consequência, diminuição da vida útil. A pasteurização do leite cru causa um aumento na atividade proteolítica e uma queda na atividade lipolítica.

Cousin (1982) citou a existência de uma fosfolipase, produzida por psicotróficos, que pode assumir papel importante na deterioração do leite. Seu mecanismo de ação seria sobre a membrana do glóbulo de gordura. Após a degradação dessa membrana, a matéria graxa do leite ficaria susceptível à ação das lipases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.58, n.6, p.828-834, Jun. 1975.
- ADHIKARI, A. K.; SINGHAL, O. P. Effect of heat resistant micro-organisms on the fatty acid profile and the organoleptic quality of UHT milk during storage. **Journal of Dairy Science**, Indian, v.45, n.5, p.272-277, May. 1992.
- ALAIS, C. **Ciencia de la leche - principios de tecnica lechera**. México: Continental, 1991. 594p.
- ALMEIDA, A. A. P.; FURTADO FILHO, J. Microorganismos psicrotróficos em leite. **Revista do Instituto de Laticíneos Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.48, n.287, p.36-40, jul./set. 1993.
- BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. **Journal of Food Protection**, Ames, v.48, n.8, p.663-667, Aug. 1988.
- BROWN, K. L. Spore resistance and ultra heat treatment processes. **Journal of Applied Bacteriology**, Normay, v.76, n.23, p.49-60, Nov. 1994. (Suppl. Symposium).
- CHOPRA, A.K.; MATHUR, D.K. Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.57, n.2, p.263-271, Feb. 1984.
- COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.1, p.157-160, Jan. 1981.
- COUSIN, M. A. Presence and ativity of psichrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n.2, p.172-207, Feb. 1982.

- . CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. **Journal of Dairy Technology**, Australian, v.47, n.1, p.50-55, Jan. 1993.
- CRIELLY, E. M.; LOGAN, A.; ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.77, n.3, p.256-263, Mar. 1994.
- FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.53, n.1, p.139-177, Feb. 1986.
- GILLIS, W. T.; CARTLEDGE, M. F.; RODRIGUES, I. R.; SUAREZ, E. J. Effect of raw milk quality on Ultra-High Temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.68, n.11, p.2875-2879, Nov. 1985.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Normay, v.76, n.23, p.61-66, Nov. 1994. (Suppl. Symposium).
- GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**, Normay, v.50, n. 4, p.289-303, Apr. 1981.
- GRIFFITHS, M. W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp present in milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.9, p.790-792, Sept. 1990.
- GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. Piracicaba: ESALQ, 1988. 85p. (Tese - Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado "Longa-vida"**. Campinas: UNICAMP, 1996. 108p. (Tese - Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- GOUNOT, A.M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederlands Melk en Zuiveltijds**, Chicago, n.42, p.1192-1197. 1986.
- HIGGINBOTTOM, C.; TAYLOR, M., M. The growth of aerobic spore-forming bacilli in sterilized milk. **Journal of Dairy Research**, London, v.27, n.2, p.221-234, Feb. 1960.
- HUHN, S; HAJDENWURCEL, J. R.; MORAES, J. M.; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. **Revista do Instituto de Laticíneos Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.209, p.3-8, maio/jun. 1980.

- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microrganismos de los alimentos. 1. técnicas de análisis microbiológico.* Zaragoza: Acribia, 1980. 431p.
- JAY, J.M. *Microbiología moderna de los alimentos.* 3.ed. Zaragoza: Acribia. 1994. 804p.
- JOHNSTON, D.W.; BRUCE, J. Incidence of thermophilic psychrotrophs in milk produced in west of Scotland. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, v.52, n.3, p.333-337, Mar. 1982.
- KASON, C. M.; PAVAMANI, I. V. P.; NAKAI, S. Simple text for milk lipolysis and changes in rancidity in refrigerated pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, Baltimore, v.55, n.10, p.1420-1423, Oct. 1972.
- KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; LADISCH, M. R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *Journal of Dairy Science*, Baltimore, v.74, n.12, p.4125-4136, Dec. 1991.
- KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *Journal of Dairy Science*, Baltimore, v.74, n.10, p.3275-3283, Oct. 1991.
- LARSEN, H. D.; JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, v. 34, n.2, p.179-186, Feb. 1997.
- McKELLAR, R. C. Development of off-flavours in ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science*, Baltimore, v.64, n.11, p.2138-2145, Nov. 1981.
- MARTIN, J. H. Symposium: heat resistant microorganisms in dairy food system. Heat resistant mesophilic microorganisms. *Journal Dairy Science*, Baltimore, v.64, n.1, p.149-156, Jan. 1981.
- MEER, R. R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M. W. Identification and characterization of heat-resistant psychrotrophic bacteria in Oregon grade A raw milk. *Dairy Food and Environmental-Sanitation*, London, v.13, n.11, p.631-637, Nov. 1993.
- MIKOLAJCIK, E. M.; SIMON, N. T. Heat resistant psychrotrophic bacteria in raw milk and their growth at 7 degree. *Journal of Food Protection*, Ames, v.41, n.2, p.93-95, Feb. 1978.

- MUTUKUMIRA, A. N.; FERESU, S. B.; NARVHUS, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.9, p.984-987, Sept. 1996.
- OVERCAST, W. W. Psychrophilic microorganisms and keeping quality of milk and in products. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.51, n.8, p.1336-1339, Aug. 1968.
- PATEL, T. R.; BARTLETT, F. M.; HAMID, J. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.2, p.90-94, Feb. 1983.
- PHILLIPS, J. D.; GRIFFITHS, M. W. Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. in pasteurized dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.61, n.4, p.275-285. 1986.
- PINHEIRO, A. J. R.; LISKA, B. J.; PARMELEE, C. E. Heat stability of lipases of selected psychrotrophic bacteria in milk and purdue swiss type cheese. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.48, n.7, p.983-984, July. 1965.
- RAVANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.20, n.3, p.164-167, Mar. 1995.
- REITER, B; HARNULV, G. Lactoperoxidase Antimicrobial System: natural occurrence, biological functions and practical applications. **Journal of Food Protection**, Ames, v.47, n.9, p.724-732, Sept. 1984.
- ROBINSON, R.K. **Microbiologia de la leche**. Espanha: Acribia, 1987, v.1. 230p.
- ROMERO, A.R. **Determinação das condições de processamento para esterilização de leite hidrolisado acondicionado em latas**. Viçosa: UFV, 1988. 76p. (Tese- Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite**. Viçosa: UFV, 1991. 104p. (Tese- Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SCHRODER, M. J. A.; BLAND, M. A. Effect of pasteurization temperature on the keeping quality of whole milk. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.51, p.569-578. 1984.

- SUTHERLAND, A.D. Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. **Journal of Dairy Research**, London, v.60, n.4, p.569-574. 1993.
- SUTHERLAND, A.D.; LIMOND, A.M. Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*. **Journal of Dairy Research**, London, v.60, n.4, p.575-580. 1993.
- TERNSTRON, A; LINDBERG, A.M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.75, p.25-34, Jan. 1993.
- THIELMANN, C. **Avaliação das características da qualidade e prazo de validade de leite tipo A**. Viçosa: UFV. 1995. 126p. (Tese - Mestrado em Tecnologia de Alimentos)
- WESTHOFF, D.C.; DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.4, p.572-580. 1981.
- WITTER, L. D. Psychrophilic Bacteria - a review. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.44, n.6, p.983-1015. 1961.
- WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Considerações a respeito da fervura doméstica do leite. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.10, n.165, p.48-52, jul. 1984.
- WOLFSON, L.M.; SUMMER, S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.10, p.887-892. 1993.
- ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteurization in milk plants. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.7, p.1540-1544, July. 1981.

CAPITULO 1

Estudo microbiológico do leite tipo B cru conservado sob refrigeração

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica do leite tipo B cru mantido sob refrigeração à 3^oC por 15 dias, enumerou-se e isolou-se um total de 180 microrganismos sendo, 80 psicrotróficos, 80 mesófilos e 20 termófilos. Também foi verificada a capacidade desses microrganismos isolados em produzirem lipólise e/ou proteólise no leite. Determinou-se os valores de acidez, pH, gordura e ácidos graxos livres durante o período de estocagem. Todos os parâmetros físico-químicos avaliados na amostra inicial estavam dentro dos padrões estabelecidos para leite tipo B. Na avaliação microbiológica, o leite apresentou altos valores nas contagens totais realizadas. Os resultados das contagens iniciais (dia 0) foram: $2,7 \times 10^4$ ufc/ml para microrganismos psicrotróficos, $1,8 \times 10^6$ ufc/ml para microrganismos mesófilos e $1,0 \times 10^1$ ufc/ml para microrganismos termófilos. No grupo psicrotrófico encontrou-se um predomínio de bacilos Gram negativos que se mostraram altamente lipolíticos, além de apresentarem atividades lipolíticas e proteolíticas associadas. O grupo mesófilo apresentou predomínio de bactérias Gram positivas, sendo a maioria caracterizada como cocos e bacilos esporulados. As atividades associadas de lipólise e proteólise nos bacilos Gram positivos foram mais acentuadas; os cocos Gram positivos, além dessas atividades associadas, mostraram-se mais lipolíticos. Todos os isolados do grupo termófilo foram classificados como bacilos Gram positivos esporulados e apresentaram atividades associadas de lipólise e proteólise, além de reações lipolíticas isoladas. A intensidade da reação proteolítica foi mais intensa nesse grupo de microrganismos.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the microbiological quality of raw type B milk, kept under refrigeration 3⁰C, for a period of 15 days, it was enumerated and isolated a total of 180 microorganisms, being, 80 psychrotrophics, 80 mesophilics, and 20 thermophilics. The ability of these microorganisms isolated to produce lypolysis and/or proteolysis in the milk was evaluated. The values of acidity, pH, fat content and free fatty acids during the storage period were determined. All physic-chemical parameters evaluated for the initial samples satisfied the legislation patterns for type B milk. Concerning to the microbiological analysis, the samples analyzed presented high values for total counting. The results for uncial counting (day 0) were: $2,7 \times 10^4$ ufc/ml for phycrotrophic, $1,8 \times 10^6$.ufc/ml for mesophilics and $1,0 \times 10^1$ ufc/ml for thermophilic microorganisms. In the group psychrotrophics bacilos gram negative predominated, being those, highly lypolitic, presenting also, associated lypolitic and proteolytic activities associated. Gram positive bacteria predominated the group of the mesophilics, being the majority characterized as sporulated cocus and bacilos. The associated activity of lypolysis and proteolysis by the gram positive bacilos were more intense; the gram positive cocus, besides the referred associated activity, showed to be more lypolitic. All isolated of the thermophilic group were classified as sporulated bacilos gram positive and presented associated activities of lypolysis and proteolysis, besides isolated lypolytic reactions. The intensity of proteolytic reaction was more intense in this group of microorganism.

1.1 INTRODUÇÃO

Quando o leite sai do úbere de uma vaca sadia contém relativamente poucas bactérias e, geralmente, estas bactérias não se multiplicam no leite manipulado sob condições normais de higiene (Frazier e Westoff, 1993)

McKinnon e Pettipher (1983), citam que, do ponto de vista tecnológico, os contaminantes mais importantes são os provenientes do meio ambiente, do ordenhador, dos utensílios e equipamentos utilizados na ordenha, da fazenda até a indústria de processamento.

O controle da qualidade microbiológica do leite e de seus derivados, assim como o monitoramento dos riscos de contaminação desses produtos são de extrema importância para a saúde pública e levantamentos epidemiológicos de toxinfecções alimentares envolvendo produtos lácteos (Langeveld et al, 1996).

No Brasil, vários estudos com este propósito tem sido realizados (Gomes, 1988; Silva, 1991; Alfenas, 1994; Cunha, Carvalho e Abreu, 1996; Vasconcelos e Jacinto, 1996), principalmente em regiões onde o armazenamento refrigerado do leite é muito utilizado com o objetivo principal de reduzir os custos de transporte, facilitando o beneficiamento na usina; os resultados mostram que mesmo pasteurizado, o leite comercializado necessita de vigilância constante. Além disso, reforçam a importância da educação continuada a ser feita com o manipulador desse alimento e sobre o seu papel de veiculador de bactérias patogênicas ou não, durante e após o processamento.

Dentro desse contexto, Covarrubias e Haverbeck (1978) encontraram contagens totais na ordem de 10^4 ufc/ ml no momento da ordenha, refletindo claramente o baixo nível sanitário

encontrado nessa etapa, levando posteriormente a contagens ao redor de 10^7 ufc/ml no momento da recepção na plataforma dos laticíneos.

Estudos realizados por Vasconcelos e Jacinto (1996) com amostras de leite "in natura" e pasteurizado, tiveram resultados na contagem total de mesófilos aeróbios na ordem de 4×10^6 ufc/ml para o leite "in natura" e 1×10^6 ufc/ml para o leite pasteurizado. O leite armazenado sob refrigeração por 3 dias antes de ser entregue para o beneficiamento, também mostrou resultados não muito satisfatórios, além de apresentar muitas das amostras fora dos padrões legais. Cunha, Carvalho e Abreu (1996) trabalhando com leite cru tipo B refrigerado, encontraram resultados variando de $4,9 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^6$ ufc/ml nas contagens totais de aeróbios mesófilos e $3,0 \times 10^2$ a $3,0 \times 10^5$ ufc/ml nas contagens de psicotróficos.

Segundo Gomes (1988), o leite refrigerado está mais exposto a contaminação e/ou multiplicação de bactérias psicotróficas; seus estudos revelaram contagens desses microrganismos atingindo ou ultrapassando o valor de 10^6 ufc/ml no 4º dia de estocagem refrigerada.

O reconhecimento das condições microbiológicas do leite cru é muito importante para a conservação do leite tratado termicamente, principalmente quando obtido de leites mantidos sob refrigeração desde a fazenda, pela possível seleção de psicotróficos. Assim sendo, Kock e Zadow (1985) citados por Gomes (1996) consideravam um leite cru de boa qualidade para o processamento UHT, aqueles obtidos com contagens totais de $1,3 \times 10^4$ ufc/ml e $7,7 \times 10^3$ ufc/ml para contagens de psicotróficos.

Este trabalho teve como objetivo, verificar a presença de microrganismos, em leite cru tipo B refrigerado, em diferentes tempos de estocagem. Também verificou-se a qualidade do leite B entregue em uma cooperativa de beneficiamento local, enumerando e isolando os microrganismos psicotróficos, mesófilos e termófilos existentes nas amostras coletadas. A capacidade dos microrganismos isolados produzirem proteólise e/ou lipólise no leite também foi verificada.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia de Alimentos e de Tecnologia de Produtos Lácteos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

1.2.1 Coleta das amostras

O leite cru tipo B foi coletado nos tanques refrigerados dos caminhões de transporte de uma cooperativa de beneficiamento local. Foram coletados 10 litros de leite cru tipo B em vasilhame tipo “latão de leite” devidamente esterilizado e mantido hermeticamente fechado. Após a coleta, o latão foi transportado sob refrigeração, em caixa de isopor contendo gelo picado, ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

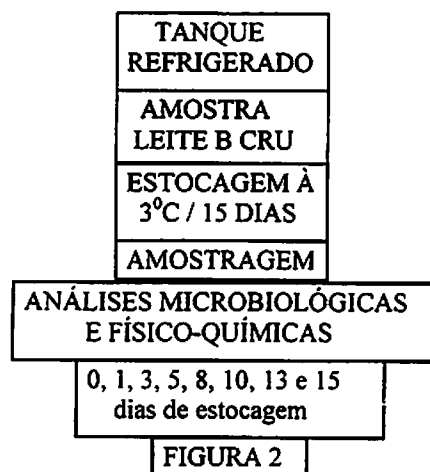


FIGURA 2

FIGURA 1.1: Esquema experimental

1.2.2 Tratamento das amostras

No laboratório, a amostra foi devidamente homogeneizada e rotulada. (Figura 1.1).

Desse latão, contendo leite cru, foram retiradas alíquotas para as análises microbiológicas e físico-químicas nos dias 0, 1, 3, 5, 8, 10, 13 e 15 de estocagem em câmara fria à $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ por 15 dias. (Figura 1.2).

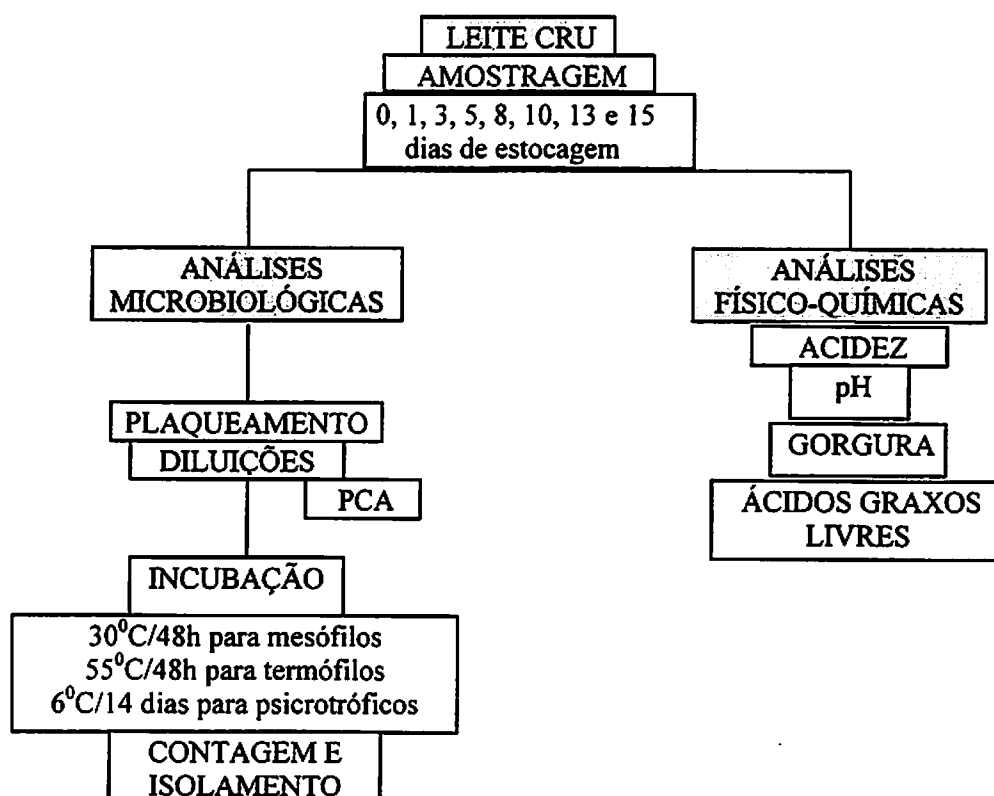


FIGURA 1.2: Esquema das análises no leite cru.

1.2.3- Análises microbiológicas

Foram utilizados os métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Marshall, 1992).

1.2.3.1- Contagem total

Após feita diluição das amostras em água peptonada 0,1% foram retirados 0,1 ml para semeadura em superfície, realizada em triplicata, utilizando meio padrão para contagem (PCA - Merck). As placas foram incubadas à 30^oC por 48 horas para contagem de microrganismos mesófilos, à 55^oC para contagem de microrganismos termófilos e a 6^oC por 14 dias para contagem de microrganismos psicotróficos.

Após os devidos períodos de incubação foram realizadas as contagens e retiradas colônias para estudos através da coloração de Gram, aspectos morfológicos e coloração de esporos, assim como verificação das atividades lipolíticas e proteolíticas. As colônias retiradas foram repicadas em PCA inclinado e mantidas em refrigerador adicionadas de óleo mineral.

1.2.3.2- Verificação da atividade proteolítica e lipolítica

Empregou-se o meio ágar leite desnatado para verificação de proteólise e ágar-tributirina para verificação de lipólise. Ambos os meios foram preparados com PCA (Merck) adicionado de 1% de leite em pó desnatado e 1% de tributirina, para as respectivas atividades. O meio foi incorporado à placa e as colônias puras foram estriadas na superfície. Após incubação à 37^oC por 48 horas, verificou-se a presença de zona clara (halo) ao redor da colônia, o que indicava a reação de proteólise e lipólise. Halos até 1 mm de espessura indicavam reação fracamente positiva, de 1 a 2 mm reação positiva (+), halos > 2 a 4 mm - reação positiva (++) e halos > 4 mm - reação positiva (+++).

1.2.3.3- Coloração de esporos

As colônias caracterizadas pela coloração de Gram como sendo Bacilos Gram positivos, foram submetidas a choque térmico para estimular a produção de esporos (80^oC por 10 minutos). Foi feita inoculação em caldo BHI (Merck) e incubação à 37^oC por 24 horas. Após incubação os tubos eram submetidos ao choque térmico e então, a coloração de esporos através do método de Wirtz-Conklin descrito por Ribeiro e Soares (1993).

1.2.4- Análises físico-químicas

Foram realizadas análises de acidez, pH, gordura (incluindo teor de ácidos graxos livres) antes (dia 0) e durante a refrigeração do leite cru.

1.2.4.1- Acidez

A acidez foi determinada titulando-se 10 ml da amostra com solução Dornic (NaOH N/9) na presença do indicador fenolftaleína, até aparecimento da coloração rósea, segundo normas analíticas preconizadas por Brasil (1981).

1.2.4.2- Gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método butirométrico de Gerber segundo normas analíticas da A.O.A.C. (1995).

1.2.4.3- pH

O pH foi determinado usando pHmetro Hanna 8314, previamente calibrado.

1.2.4.4- Ácidos graxos livre (AGL)

Utilizou-se o método titulométrico proposto por Mahieu (1983) utilizado e citado por Wolfschoon-Pombo, Carvalho e Fischer (1986), no qual após extração dos AGL da amostra, realiza-se lavagem dos mesmos em ácido sulfúrico a 0,05% (v/v) e titulação com solução de hidróxido de potássio alcoólico 0,002N; sendo o resultado expresso em mEq/L.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1- Condições Físico-químicas

O leite cru foi analisado nos dias de estocagem: 0 (dia da coleta da amostra), 1, 3, 5, 8, 10, 13 e 15. Os resultados obtidos nas análises realizadas estão apresentados na tabela 1.1.

TABELA 1.1: Valores obtidos nas determinações de acidez, pH, gordura e ácidos graxos livres em leite tipo B cru refrigerado nos diferentes dias de estocagem

Dia	Acidez (^o D)	pH	Gordura (%)	Ác. graxos livres(mEq/L)
0	16,0 ⁰	6,74	3,9	1,815
1	16,0 ⁰	6,73	3,9	2,062
3	16,0 ⁰	6,73	3,9	2,145
5	16,0 ⁰	6,72	3,9	2,145
8	16,0 ⁰	6,69	3,9	2,310
10	16,5 ⁰	6,68	3,9	2,310
13	21,5 ⁰	6,25	3,9	2,390
15	28,0 ⁰	6,05	3,9	3,547

Os valores iniciais de pH, acidez e gordura estavam dentro dos padrões estabelecidos para leite tipo B (Brasil, 1980).

O aumento da acidez no decorrer da estocagem refrigerada, assim com o abaixamento do pH (apesar de serem fatores independentes), podem ser devidos ao crescimento microbiano e a produção de seus metabólitos, causando a alteração do produto. No 13^o dia de estocagem, o leite em estudo se encontrava em início de coagulação, com alterações perceptíveis de sabor e odor (rançoso)–

A ausência de alteração no teor de gordura no decorrer da estocagem refrigerada já era esperada. Isso porque, mesmo hidrolisada a ácidos graxos de cadeias curtas, ela continua sendo medida integralmente pelo método butirométrico, que não especifica qual tipo de gordura está sendo analisada.

Os resultados encontrados para determinação dos ácidos graxos livres mostraram-se aumentados no decorrer da estocagem. De acordo com os resultados obtidos nas análises microbiológicas (item 1.3.2.4), a quantidade de microrganismos lipolíticos também aumentou. Além da lipólise de origem microbiana, pode-se sugerir ação de lipases naturais. Segundo Alais (1991) a lipólise do leite pode ocorrer espontaneamente, sob ação de lipases naturais do leite, sem ativação enzimática e na ausência de bactérias lipolíticas. Hereditariedade, longos períodos de lactação e a alimentação são fatores que afetam esse tipo de lipólise. Segundo Thielman (1995), a homogeneização da amostra também aumenta a lipólise, tanto a natural quanto a microbiana, isso porque ela reduz a quantidade de material da membrana, que funciona como barreira entre a gordura e a lipase, modificando sua organização e facilitando a ação da enzima.

1.3.2- Condições microbiológicas

1.3.2.1- Aspectos gerais da qualidade microbiológica do leite tipo B cru

O desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos, mesófilos e termófilos durante o período de estocagem encontra-se demonstrado na figura 1.3.

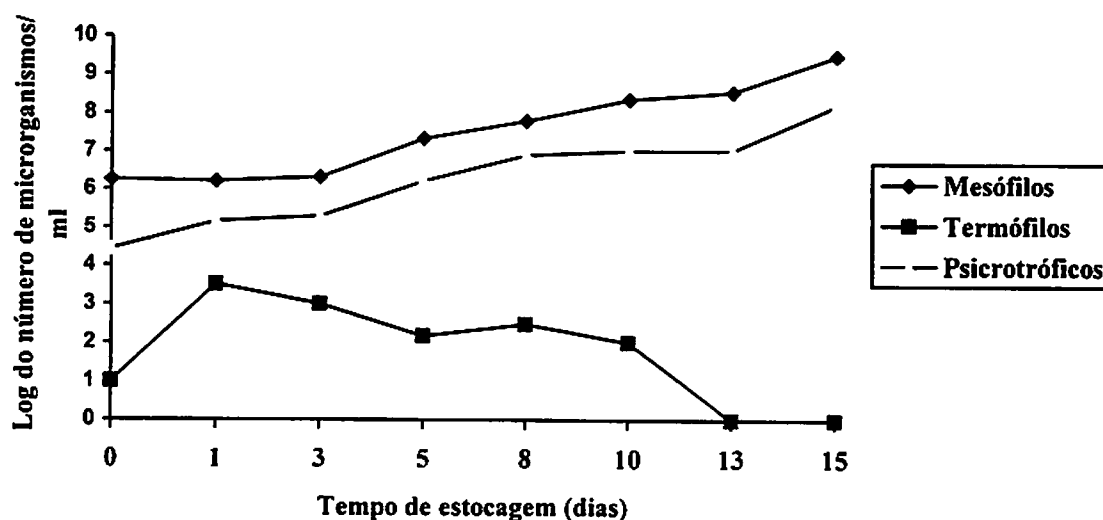


FIGURA 1.3: Log do número de microrganismos isolados do leite B cru em diferentes dias de estocagem sob refrigeração.

Os altos valores nas contagens totais refletem a baixa qualidade do leite em estudo e podem ter ocorrido principalmente por falhas na higienização (da fazenda ao laticínio) e também pelo uso de temperaturas inadequadas para estocagem e transporte. Além disso, para tornar o transporte refrigerado economicamente viável, leites de vários produtores são misturados em um só tanque ao chegarem no laticínio, até obtenção de volume suficiente para abastecer os caminhões. O leite de alguns desses produtores apresentam contagens altas quando chegam à plataforma de recepção, como constatado através de dados referentes às contagens fornecidos pela cooperativa local.

1.3.2.2- Avaliação da flora microbiana do leite

1.3.2.2.1- Avaliação dos microrganismos psicotróficos

A flora psicotrófica do leite cru variou na ordem de 10^4 a 10^8 ufc/ml durante o período de estocagem. Segundo a legislação brasileira (Brasil, 1980) a flora psicotrófica não deve ultrapassar a 10% o número de microrganismos mesófilos, fato que é claramente observado nesse trabalho (Figura 1.3).

Também de acordo com os dados obtidos no laticínio, a presença elevada desses microrganismos pode ser devido ao tempo em que o leite permanece estocado refrigerado, até que o volume desejado seja atingido. Muitos produtores dessa região estocam leite de mais de uma ordenha, antes de entregá-lo ao laticínio. Isso também ocorre no laticínio, onde grandes volumes de leite permanecem refrigerados por 3 a 4 dias antes do processamento. Nesse trabalho, as altas contagens obtidas podem ser atribuídas ao tempo e temperatura de refrigeração na qual esse leite permaneceu até a coleta da amostra. Os estudos realizados por Cunha, Carvalho e Abreu (1996) em leite cru tipo B refrigerado, apresentaram resultados de psicotróficos variando na ordem de 10^2 a 10^5 ufc/ml em várias amostras coletadas de um mesmo produtor, demonstrando falhas na higienização e estocagem inadequada do produto.

1.3.2.2.2- Avaliação dos microrganismos mesófilos

As contagens totais para microrganismos mesófilos (Figura 1.3) efetuadas nos diferentes dias de estocagem refrigerada do leite, apresentaram-se fora do padrão estabelecido para o leite

tipo B cru que é de $5,0 \times 10^5$ ufc/ml (Brasil, 1980), sendo encontrado valores entre 10^6 a 10^9 ufc/ml.

Deve-se ressaltar que o valor obtido no dia 0 (dia da coleta da amostra) é que realmente expressa a carga microbiológica da amostra, e decorre, provavelmente da multiplicação de microrganismos contaminantes que foram favorecidos pelas condições inadequadas de higiene, de armazenamento e manuseio do produto, até a entrega no laticínio.

O aumento gradativo no decorrer da estocagem como consequência direta da refrigeração, pode ser devido a capacidade desses microrganismos se multiplicarem em temperaturas mais baixas, ou pode ser explicado pelo tempo que estas células gastaram para se adaptarem ao crescimento no frio. Antunes e Oliveira (1986) encontrou elevados valores médios em contagens de mesófilos em leite tipo B refrigerado ($6,03 \times 10^6$ ufc/ml), propondo que esses altos valores poderiam ser devidos tanto pelas condições inadequadas de higiene e manuseio do produto, como por estocagem refrigerada inadequada e prolongada. Variações nas contagens de mesófilos também foram observadas por Silva (1991) em estudos sobre a influência do resfriamento realizado na fazenda (logo após a ordenha) e no momento da entrega no laticínio.

1.3.2.2.3- Avaliação dos microrganismos termófilos

A presença de microrganismos termófilos em leite não é muito frequente, isso porque com o aumento do uso da refrigeração, raramente o leite permanece após a ordenha em temperaturas mais elevadas. Como demonstrado na figura 1.3, os valores obtidos nas contagens realizadas para esse grupo de microrganismos, variando na ordem de 10^1 a 10^2 ufc/ml. De acordo com dados obtidos no laticínio, vários produtores ainda usam o sistema de latões para entrega de seu leite. Esses latões na maioria das vezes permanecem em temperaturas inadequadas prejudicando uma melhor conservação do produto. Há também o fato de que muitos desses produtores não usam refrigerar o leite logo após a ordenha, e permitem que ele permaneça “quente” até a entrega no laticínio, fato que na maioria das vezes demora de 30 minutos a 3 horas. Froeder, Pinheiro e Brandão (1985) analisando a flora presente em latões de leite, verificou que as contagens de termófilos variaram na ordem de 10^0 a 10^5 ufc/ml, sendo a maioria com resultados entre 0 e 10^3 ufc/ml, quando os latões permaneciam por mais tempo em temperaturas inadequadas.

Baseado nessas condições, onde há deficiências higiênicas tanto no manuseio do leite como na limpeza dos utensílios e equipamentos, e não há emprego adequado de refrigeração para afastar a temperatura do leite da temperatura ambiente, as contagens obtidas devem ser consideradas de relativa importância na manutenção da qualidade, visto que, esses microrganismos podem representar problemas no leite e produtos lácteos quando estes ficarem expostos, por um período relativamente longo, à temperaturas mais elevadas ou quando forem submetidos a algum tratamento térmico, que propiciará a germinação dos seus esporos.

Como os resultados (no experimento) apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos para o leite tipo B, fez-se um controle diário, por um período de 7 dias. Os resultados estão apresentados na tabela 1.2, com seus respectivos locais de coleta, não mostrando diferenças marcantes dos encontrados nesse trabalho, ou seja, todas as amostras coletadas estavam bem próximas dos valores limites dos padrões estabelecidos.

TABELA 1.2: Contagens totais de microrganismos mesófilos realizadas em controle diário e na usina de beneficiamento.

AMOSTRA (dias)	LOCAL DE COLETA (carretas)	CONTAGEM LOCAL	CONTAGEM NO DESTINO
1 ^o	depósito interno	8,5 x 10 ⁴	5,4 x 10 ⁵
2 ^o	01	3,7 x 10 ⁵	7,3 x 10 ⁵
3 ^o	02	1,1 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁵
4 ^o	03	1,1 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁵
5 ^o	04	2,6 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁵
6 ^o	05	2,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵
7 ^o	06	1,8 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁵

A amostra coletada no primeiro dia foi retirada de um depósito interno do laticínio, mantido sob refrigeração, de onde o leite passando por tubulações, chega até os caminhões refrigerados que transportam esse leite para a usina de beneficiamento; as demais amostras foram retiradas diretamente dos caminhões refrigerados. Essa análise paralela serviu para confirmar que o leite chegou ao seu destino com contagens muito próximas do padrão (algumas até excedendo esse valor), indicando claramente as falhas de higienização na obtenção e entrega do produto,

além da recontaminação sofrida ao passar do depósito para o tanque refrigerado do caminhão, através das tubulações.

Convém salientar que, no local de destino, esse leite em estudo foi recusado como tipo B e desclassificado para leite tipo C, devido as altas contagens apresentadas.

1.3.2.3- Caracterização dos grupos de microrganismos

A tabela 1.3 mostra os grupos microbianos isolados no leite cru tipo B refrigerado.

TABELA 1.3: Números e porcentagens dos grupos microbianos isolados do leite cru tipo B refrigerado

GRUPOS MICROBIANOS	Psicrotróficos		Mesófilos		Termófilos	
	nº col.	%	nº col.	%	nº col.	%
Gram positivos	16	20	52	65	19	95
Gram negativos	64	80	28	35	0	0
Cocos	0	0	18	22,5	0	0
Bacilos Gram positivos esporulados	12	15	18	22,5	19	95
Bacilos Gram positivos sem esporos	4	5	16	20	0	0
Bacilos Gram negativos	64	80	28	35	0	0
Perdas	0	0	0	0	1	5
Total	80	100	80	100	20	100

1.3.2.3.1- Avaliação dos microrganismos psicrotróficos

Durante o período de estocagem foram isoladas 80 colônias de psicrotróficos, sendo 16 (20%) Gram positivas e 64 (80%) Gram negativas (Tabela 1.3). O predomínio de psicrotróficos Gram negativos é confirmado por Ternstron, Lindberg e Molin (1993), que associam os psicrotróficos Gram negativos como os principais contaminantes e deteriorantes do leite mantido sob refrigeração. Também Alfenas (1994) cita esse grupo como o mais frequentemente encontrado.

Dentre os bastonetes Gram positivos 15% eram esporulados. Segundo Ternstron, Lindberg e Molin (1993), os bacilos Gram positivos formadores de esporos formam o segundo grupo mais importante na deterioração de produtos lácteos; isso reforça os resultados obtidos, nos quais a

presença dos bacilos esporulados só é superada pela maioria quase absoluta (80%) de bacilos Gram negativos. Vale salientar que a pasteurização convencional destrói a maioria destes microrganismos Gram negativos, enquanto que as enzimas por eles produzidas permanecem ativas. A esta grande maioria de microrganismos Gram negativos podem pertencer bactérias do gênero *Pseudomonas*, que é uma bactéria de grande importância dentro do grupo psicrotrófico como deterioradora de leite e derivados. Kohlmann et al (1991) relata a importância desse gênero na indústria de laticíneos principalmente no que se refere a produção de enzimas em produtos mantidos em estocagem refrigerada. Essas bactérias, causam problemas no leite cru, estocado sob refrigeração prolongada, tornando o produto inaceitável para o consumo (produção de sabores e odores indesejáveis).

1.3.2.3.2- Caracterização dos microrganismos mesófilos

Os dados na tabela 1.3 mostram que dos 80 microrganismos mesófilos isolados, 52 (65%) foram Gram positivos e 28 (35%) Gram negativos, ao contrário do que ocorreu com o grupo psicrotrófico no qual as bactérias Gram negativas foram as predominante. Martin (1981) relata o predomínio de flora Gram positiva mesófila, com os bacilos Gram positivos esporulados representando a maioria dos isolados no leite cru e associa a presença desses bacilos a contaminações de origem ambiental (superfície externa do úbere, uso de cochos para alimentação, camas, fezes e uso de latões sem a devida higienização).

1.3.2.3.3- Avaliação dos microrganismos termófilos

Do grupo dos termófilos foram retiradas 20 colônias, com predomínio absoluto de bacilos esporulados (95% dos isolados). Chopra e Mathur (1984) observaram o crescimento de esporos no leite cru e outros produtos lácteos estocados à 7^oC, por 7 dias, e enfatizaram a capacidade desses microrganismos sobreviverem a tratamentos térmicos e causarem proteólises durante a estocagem à frio. O comportamento desse grupo de microrganismos faz com que eles constituam fator limitante de grande significado na vida de prateleira do leite pasteurizado e de outros produtos derivados.

1.3.2.4- Avaliação das atividades proteolíticas e lipolíticas dos grupos estudados

Foram medidas as intensidades de lipólise e proteólise dos isolados em ágar tributirina e ágar leite desnatado, respectivamente. Os resultados são mostrados nas figuras 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 e 1.8.

As atividades lipolíticas e proteolíticas em produtos lácteos mantidos sob refrigeração são muito correlacionadas com a presença do grupo psicrotrófico, sendo os bacilos Gram negativos os principais causadores de deterioração nesses produtos. Na figura 1.4 verifica-se que 64 (43,75%) dos bacilos Gram negativos mostraram somente atividade lipolítica e 28 (35%) deles foram bacilos com atividades lipolíticas e proteolíticas. A proteólise como atividade isolada foi constatada em apenas 1 (1,25%) desses bacilos.

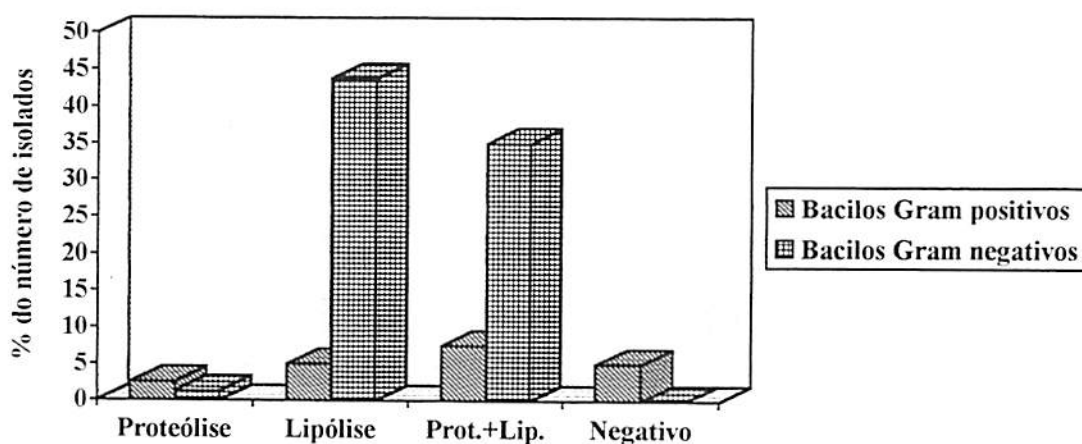


FIGURA 1.4: Relação em porcentagem da atividade proteolítica e lipolítica dos microrganismos psicrotróficos isolados no leite cru.

Os bacilos Gram positivos também apresentaram atividades lipolíticas e proteolíticas, sendo que 2 dos isolados (2,5%) apresentaram somente atividade proteolítica, 4 (5,0%) apresentaram atividade lipolítica, 6 (7,5%) apresentaram atividades associadas de proteólise e lipólise e 4 (5,0%) não apresentaram nenhuma das atividades em estudo. Esses 4 bacilos que não apresentaram atividades não eram formadores de esporos.

As observações de Stead (1987), sobre linhagens de bactérias psicrotróficas Gram negativas, proteolíticas e lipolíticas, cultivadas em leite, que mantiveram altas contagens celulares e altas atividades de enzimas extracelulares durante incubação prolongada à temperatura de

refrigeração, servem para demonstrar o potencial de deterioração desses microrganismos. Deve-se enfatizar que as reações mais intensas, tanto lipolíticas como proteolíticas ocorreram após o 8^o dia de estocagem refrigerada, quando a contagem dos microrganismos encontrava-se na ordem de 10^6 ufc/ml.

Dentro do grupo de microrganismos mesófilos encontram-se a maioria dos contaminantes do leite, sendo estes os que crescem melhor em condições ambientais; como são capazes de crescerem de 10^0 a 45^0C , abrangem a faixa de temperatura em que os produtos permanecem, senão todo o tempo, pelo menos por um bom número de horas. Das 80 bactérias mesófilas isoladas apenas 1,25% não apresentaram atividade proteolítica, nem lipolítica. (Figura 1.5)

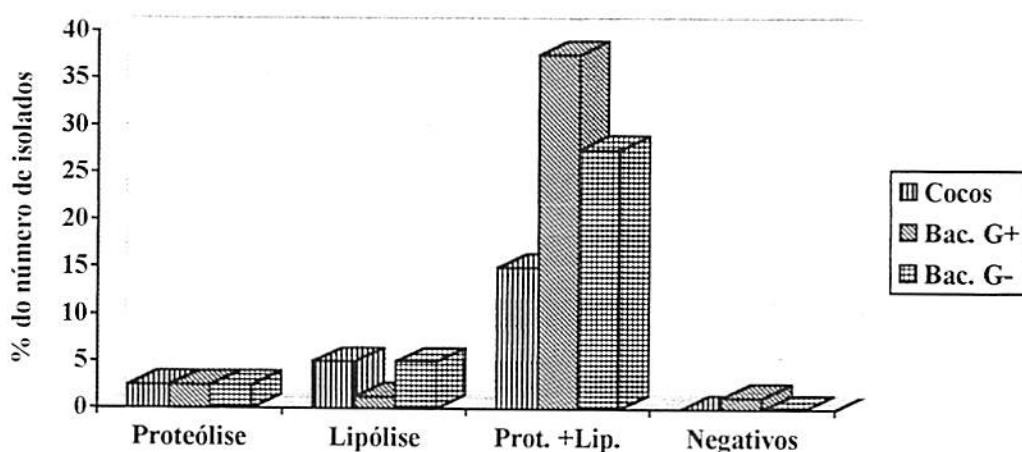


FIGURA 1.5: Relação em porcentagem da atividade proteolítica e lipolítica dos microrganismos mesófilos isolados no leite cru.

Os bacilos Gram positivos foram os mais representativos desse grupo, sendo que a maioria eram bacilos formadores de esporos. A atividade proteolítica analisada separadamente foi detectada em 2,5% desses bacilos e a atividade lipolítica em apenas 1,25%. Os bacilos Gram positivos apresentaram atividades proteolíticas e lipolíticas associadas em 37,5% de seus representantes. Em termos de intensidade de reação, as atividades lipolíticas não foram tão intensas quanto as proteolíticas. Essa intensidade de reação refere-se ao diâmetro do halo produzido ao redor das colônias no ágar leite desnatado e no ágar tributirina (Figuras 1.7 e 1.8).

A importância dos bacilos Gram positivos dentro do grupo mesofílico podem ser confirmados pela revisão de Gomes (1996). O autor salienta a importância desses bacilos na indústria láctea, pois além da termorresistência conferida pela capacidade de produzirem esporos, produzem também enzimas proteolíticas que são prejudiciais ao leite e seus sub-produtos, causando odores e sabores estranhos; eles também são responsáveis pelo desenvolvimento de rancificação, uma vez que produzem também lipases termorresistentes.

Com relação aos cocos Gram positivos, foi constatada a presença de atividades lipolíticas e proteolíticas em todos os seus representantes. Dos cocos isolados, 2,5% apresentaram somente atividade proteolítica, 5,0% apresentaram atividade lipolítica e 15% apresentaram atividades lipolíticas e proteolíticas associadas, sendo a lipólise mais intensa que a proteólise. Os resultados de Venugopal, Ingham e McCurdy (1994) confirmam esses dados; segundo os autores a maioria dos cocos isolados em sua pesquisa mostram-se fortemente lipolíticos, além de também apresentarem atividade proteolítica. Segundo Bhowmik e Marth (1990) as enzimas proteolíticas produzidas por alguns cocos Gram positivos, catalase positiva, no leite cru, tem importância somente na maturação de queijos, não constituindo problemas em produtos que sofrerão tratamentos térmicos mais severos, porque são termolábeis.

Os bacilos Gram negativos representando o segundo grupo mais importante da flora mesofílica, também apresentaram reações proteolíticas e lipolíticas em todos os seus representantes. A atividade proteolítica isolada foi constatada em 2,5%, a atividade lipolítica em 5,0% e 27,5% das bactérias Gram negativas apresentaram atividade tanto proteolítica como lipolítica, sendo que a atividade lipolítica destas bactérias foi mais intensa do que a proteolítica. Griffiths (1990) relatou a presença marcante, em leite, de bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos e catalase positiva. Muitos desses bastonetes estavam associados com a proteólise e lipólise em leite e derivados; sendo que produção de lipólise era intensificada pelo uso da refrigeração.

O predomínio de bacilos Gram positivos esporulados é uma característica marcante no grupo de microrganismos termófilos, que representaram neste experimento quase a totalidade dos

isolados. A atividade lipolítica foi constatada em 20% desses bacilos e as atividades lipolíticas e proteolíticas associadas foram constatadas em 50% deles. A figura 1.6 mostra a porcentagem de reações lipolíticas e proteolíticas desses microrganismos termófilos.

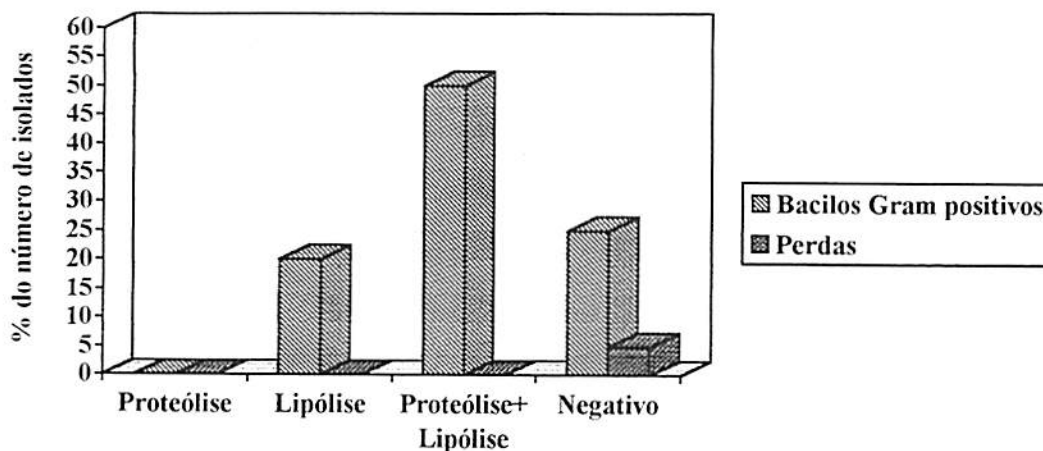


FIGURA 1.6: Relação em porcentagem da atividade proteolítica e lipolítica dos microrganismos termófilos isolados no leite cru.

Dentro do grupo termófilo a atividade proteolítica foi mais intensa que a atividade lipolítica, visto que as reações observadas em placas de ágar tributirina variaram de fracamente positivas (halos de 1 mm) a positivas + (halos de 1 a 2 mm) para a atividade lipolítica. Chopra e Mathur (1984) trabalhando com bactéria termofílica, também encontraram intensas reações de proteólise; segundo os autores, os termófilos são um grupo importante de microrganismos que causam deterioração em produtos lácteos, principalmente em países tropicais, onde a alta temperatura ambiente proporciona um ambiente condizente para o seu crescimento.

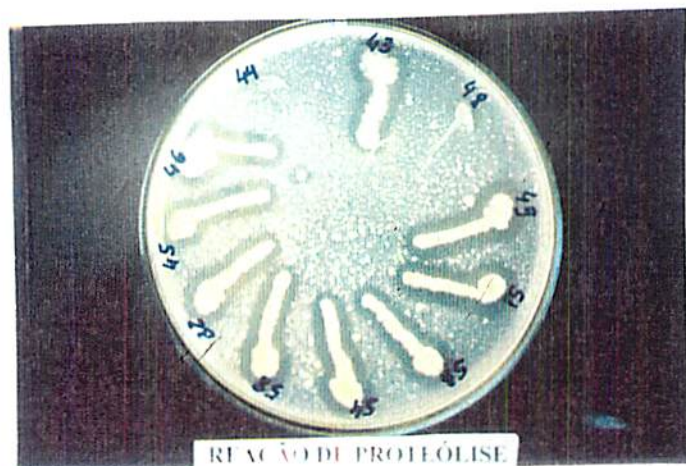


FIGURA 1.7: Verificação da reação de proteólise: halos apresentados pelos microrganismos mesófilos em ágar leite desnatado.

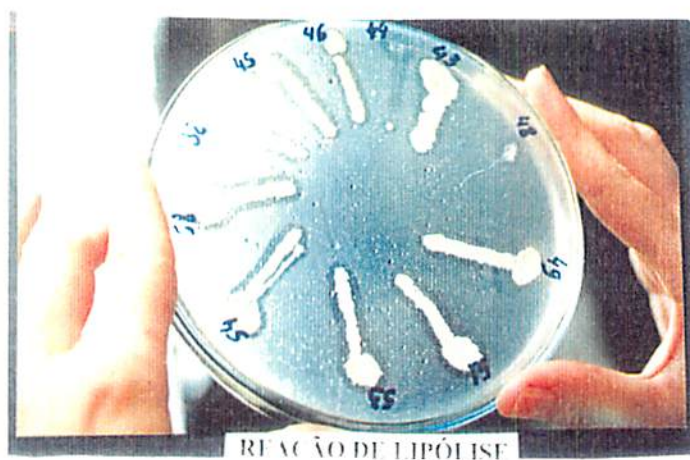


FIGURA 1.8: Verificação da reação de lipólise: halos apresentados pelos microrganismos mesófilos em ágar tributirina

4 CONCLUSÕES

Embora o leite em estudo tenha apresentado condições físico-químicas compatíveis com os padrões estabelecidos para leite tipo B, sua avaliação microbiológica mostrou-se fora desses padrões.

A constatação de altos valores nas contagens de psicotróficos deve-se principalmente ao tempo em que o leite permaneceu sob refrigeração, tanto nas fazendas como no laticínio, onde a permanência do leite por até 3 a 4 dias sob refrigeração antes do envio para o processamento, favoreceu a multiplicação desse grupo de microrganismo.

A maioria dos microrganismos isolados apresentaram atividades enzimáticas (proteolíticas e lipolíticas) isoladas ou associadas, em intensidade e frequência variáveis.

A atividade lipolítica apresentada pelos microrganismos foi superior no grupo psicotrófico, sendo que os bacilos Gram negativos foram os principais responsáveis por tal reação.

A maior incidência de atividades associadas de lipólise e proteólise foi verificada no grupo mesófilo, sendo os bacilos Gram positivos os principais representantes. A flora contaminante Gram negativa também se mostrou expressiva na apresentação dessas atividades associadas.

O grupo termófilo foi representado exclusivamente por bacilos Gram positivos esporulados. Esses microrganismos apresentaram atividades lipolíticas e proteolíticas bem expressivas, porém a intensidade da reação proteolítica foi maior nesse grupo de microrganismos. Esses esporos formados conferem uma maior estabilidade térmica às bactérias frente ao tratamento que será empregado, assim sendo é recomendado o uso de temperaturas mais elevadas para o tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAIS, C. **Ciencia de la leche - principios de tecnica lechera.** México: Continental, 1991. 594p.
- ALFENAS, R. C. G. **Efeito da temperatura no crescimento e determinação dos parâmetros de resistência ao calor de psicrotrófico acidificante isolado do leite.** Viçosa: UFV, 1994. 55p. (Tese - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- ANTUNES, L. A. F.; OLIVEIRA, J. S. **Qualidade microbiológica de leite cru.** *Revista do Instituto de Laticíneos Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v.41, n.244, p.20-24, mar./abr. 1986.
- ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 12ed, Washington, 1995. 1094p.
- BHOWMIK T.; MARTH, E. H. **Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review.** *Journal of Dairy Science*, Baltimore, v.73, n.4, p.859-866, Apr. 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA.** Brasília, 1980. 116p.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos.** Brasília, 1981. p.ir.
- CHOPRA, A.K.; MATHUR, D.K. **Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products.** *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, v.57, n.2, p.263-271, Feb. 1984.
- COVARRUBIAS, M. P.; HAVERBECK, J. **Variações na qualidade do leite cru. Fase estábulo-indústria.** *Revista do Instituto de Laticíneos Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v.33, n. 196, p.3-12, maio/jun. 1978.

- CUNHA, L. T.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Determinação das condições físico-químicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15, Poços de Caldas, 1996. **Resumos...**Lavras: UFLA, 1996. Cap.2, p.73.
- FRAZIER, W. C.; WESTOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.
- FROEDER, E.; PINHEIRO, A. J. R.; BRANDÃO, S. C. C. Variação da qualidade microbiológica do leite cru tipo C na região de Viçosa. **Revista do Instituto de Laticíneos Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.40, n.241, p.55-68, set./out. 1985.
- GRIFFITHS, M. W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp present in milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.9, p.790-792, Sept. 1990.
- GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. Piracicaba: ESALQ, 1988. 85p. (Tese - Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado "Longa-vida"**. Campinas: UNICAMP, 1996. 108p. (Tese - Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; LADISCH, M. R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.74, n.12, p.4125-4136, Dec. 1991.
- KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.74, n.10, p.3275-3283, Oct. 1991.
- LANGEVELD, L. P. M.; VAN SPRONSEN, W. A.; VAN BERESTEIJN, E. C. H.; NOTERMANS, S. H. W. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.7, p.723-726, July. 1996.
- MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 416p.
- McKINNON, C.H.; PETTIPHER, G.L. A survey of sources of heat-resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. **Journal of Dairy Research**, London, v.50, n.1, p.163-170, Jan. 1983.

- McKINNON, C.H.; PETTIPHER, G.L. A survey of sources of heat-resistant bacteria with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. **Journal of Dairy Research**, London, v.50, n.1, p.163-170, Jan. 1983.
- MARTIN, J. H. Symposium: heat resistant microorganisms in dairy food system. Heat resistant mesophilic microorganisms. **Journal Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.1, p.149-156, Jan. 1981.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual - bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112p.
- SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite**. Viçosa: UFV, 1991. 104p. (Tese- Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- STEAD, D. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.54, n.4, p.539-543, Apr. 1987.
- TERNSTRON, A; LINDBERG, A.M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.75, p.25-34, Jan. 1993.
- THIELMANN, C. **Avaliação das características da qualidade e prazo de validade de leite tipo A**. Viçosa: UFV. 1995. 126p. (Tese- Mestrado em Tecnologia de Alimentos)
- VASCONCELOS, J. C. de ; JACINTO, A.C.de O. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do leite tipo B e C e de queijos comercializados na região de Maringá-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15, Poços de Caldas, 1996. **Resumos...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1996. Cap.2, p.71.
- VENUGOPAL, R. J.; INGHAM, S. C. ; McCURDY, A. R. Identification of psychrotrophic *Micrococcaceae* spp. isolated from fresh beef stored under carbon dioxide or vacuum. **International Journal of Food Microbiology**, Madison, v.23, n.2, p.167-178, Feb. 1994.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; CARVALHO, F.A.; FISCHER, R. Ácidos graxos livres no leite de plataforma. **Revista do Instituto de Laticíneos Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v.42, n.244, p.8-12. 1986.

CAPITULO 2

EFEITO DA APLICAÇÃO DE TRATAMENTO TÉRMICO EM LEITE B CRU A SER REFRIGERADO

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo verificar a presença de microrganismos em leite cru tipo B submetido a aquecimento à 80⁰C/ 12 minutos e estocado sob refrigeração por 15 dias. Além da eficiência do tratamento térmico empregado, isolamento e caracterização dos microrganismos isolados, verificou-se a capacidade destes em produzirem lipólise e/ou proteólise no leite. Foram isolados 81 microrganismos sendo, 20 psicotróficos, 41 mesófilos e 20 termófilos durante a estocagem refrigerada. Os resultados das análises microbiológicas foram 1,0 x 10¹ufc/ml para microrganismos psicotróficos, 5,0 x 10⁴ufc/ml para microrganismos mesófilos e 1,0 x 10¹ufc/ml para microrganismos termófilos. No grupo mesófilo e termófilo verificou-se um predomínio de bacilos Gram positivos esporulados e no grupo psicotrófico ocorreu predomínio absoluto de bacilos Gram negativos. Esses bacilos Gram negativos mostraram-se 100% lipolíticos e proteolíticos. Os bacilos Gram positivos esporulados do grupo mesófilo mostraram-se mais lipolíticos do que proteolíticos, apesar da maioria ter apresentado atividades associadas de proteólise e lipólise. O grupo termófilo também apresentou atividades associadas (50% do total), porém a atividade proteolítica foi mais marcante nesse grupo de microrganismos.

ABSTRACT

The aim of this work was to verify the presence of microorganisms in raw type B milk heated at 80⁰ C for 12 minutes and kept under refrigerated storage for 15 days. Besides the efficiency of the heat treatment utilized, isolation and characterization of the microorganisms, it was also verified the ability of such organisms to produce lypolysis and/or proteolysis in the milk. It was isolated 81 microorganisms being, 20 psychrotrophics, 41 mesophylics and 20 thermophylics, during the refrigeration period. The results of the microbiological analysis were: 1,0 x 10¹ cfu/ml for psychrotrophycs, 5,0 x 10⁴ ufc/ml. for mesophilics and 1,0 x 10¹ ufc/ml for thermophylics microorganism. Within those isolates mesophylics and thermophylics sporulated gram positive bacillus predominated, whereas in the psychrotrophyc group, gram negative bacilos was the vast majority, which showed 100% both lypolytics and proteolytics activities. The sporulated gram positive bacillus belonging to the mesophylic group showed to be more lypolytic than proteolitics, despite the majority has presented proteolytic and lypolytic associated activity. The thermophylic group also showed associated activities (50% of the total), but the proteolytic activity was more intense for this group of microorganisms.

2.1 INTRODUÇÃO

Há um grande interesse em manter a qualidade do leite tratado termicamente. Os principais fatores que afetam a manutenção da qualidade do leite pasteurizado são a qualidade do leite cru, severidade do tratamento térmico empregado, a contaminação pós-pasteurização e a temperatura de armazenamento (Ravanis e Lewis, 1995).

A combinação de resistência térmica e propriedades psicrotróficas de alguns microrganismos, representam um grande potencial de deterioração de produtos lácteos perecíveis. O uso crescente de temperaturas de pasteurização cada vez mais altas e o prolongamento da estocagem refrigerada, tanto no leite cru como no tratado termicamente, agravam o significado desse grupo de microrganismo na indústria de produtos lácteos (Meer et al., 1991).

Estudos realizados por Mikolajick e Simon (1978) revelaram que o leite cru de média qualidade microbiana, tratado à 80⁰C por 12 minutos, ainda contém microrganismos viáveis após o tratamento, sendo que essa viabilidade referia-se aos esporos formados. Mais recentemente, Feijoo e Bodyfelt (1990) citaram uma modificação nessa técnica de Mikolajcik e Simon visando uma maior sobrevivência de psicrotróficos formadores de esporos. Os autores realizaram o aquecimento à 75⁰C por 30 minutos e confirmaram que houve uma maior sobrevivência desses microrganismos esporulados.

Uma das principais características da bactéria formadora de esporos é sua extrema resistência ao aquecimento; os esporos de algumas espécies de *Bacillus* são capazes de sobreviver ao aquecimento à 100⁰C por vários minutos (Setlow, 1994).

A presença de bactéria termodúrica formadora de esporo em amostras de leite cru e processado tem sido amplamente verificada, principalmente no que se refere a variações sazonais. Segundo Larsen e Jorgensen (1997) a maior incidência desses microrganismos formadores de esporos ocorre no período de verão, principalmente aqueles relacionados com

doenças do tipo alimentar. Os estudos de Meer et al (1991) revelaram que os organismos formadores de esporos eram primariamente mesófilos, embora linhagens termófilas esporuladas também foram registradas.

(R) A maioria dos psicrotóxicos, não sobrevivem à tratamentos térmicos (pasteurização e termalização, por exemplo), sendo rara a presença de bactérias Gram negativas devido a sua baixa resistência térmica (Schroder e Bland, 1984). Segundo os autores, as bactérias Gram negativas do gênero *Pseudomonas* podem sobreviver aos tratamentos térmicos quando presentes, no leite cru, em quantidades acima de 10^6 UFC/ml.

O leite também está sujeito a contaminações após o tratamento térmico, sendo as bactérias Gram negativas as principais representantes capazes de crescer e elaborar seus produtos metabólicos em leites armazenados sob refrigeração. À 7°C , por exemplo, um tempo de geração de menos de seis horas poderá ser possível; isso demonstra que a contaminação de um litro de leite, por uma única bactéria, resultará em mais de dez milhões de bactérias por ml de leite, após um período de estocagem de oito dias (Kroll e Rodrigues, 1986). As alterações sensoriais geralmente se desenvolvem em leites pasteurizados comercialmente quando as contagens atingem 10^7 a 10^8 UFC/ml. Os autores citam que tais alterações podem ser observadas quando o número de psicrotóxicos excede 10^6 UFC/ml.

Tendo em vista o importante papel que os microrganismos desempenham com relação à qualidade e conservação do leite tratado termicamente, este trabalho teve como objetivo verificar a presença de microrganismos em leite tipo B aquecido à 80°C , estocado refrigerado por 15 dias. Também verificou-se a eficiência do tratamento utilizado, isolando e identificando os microrganismos esporulados, assim como os psicrotóxicos. A capacidade desses microrganismos produzirem proteólise e/ou lipólise também foi verificada.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.2.1- Coleta da amostra

O leite cru tipo B foi coletado no tanque refrigerado de um dos caminhões de transporte de uma cooperativa local. Foram coletados 10 litros de leite cru em vasilhame tipo “latão de leite” devidamente esterilizado e mantido hermeticamente fechado. Após a coleta, o latão foi transportado sob refrigeração, em caixa de isopor contendo gelo picado, ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras., MG.

2.2.2- Tratamento das amostras

No laboratório, a amostra foi devidamente homogeneizada e dividida em 4 beakers de 2000 ml (Pirex) para o tratamento térmico. Os beakers foram colocados em banho-maria (Quimis) com sistema de água circulante regulado para aquecimento à 80⁰C. Quando o leite atingiu a temperatura desejada (80⁰C) foi marcado o tempo de 12 minutos, sendo as amostras homogeneizadas com auxílio de bastão de vidro esterilizado. Essa homogeneização foi realizada sem movimentos bruscos ou agitação forte, em intervalos de aproximadamente 3 minutos (Mikolajick e Simon, 1978). Terminado o tempo, as amostras foram transferidas para um novo latão previamente esterilizado e resfriadas à 10⁰C em banho de gelo. Após a retirada de uma alíquota para as análises microbiológicas iniciais (dia 0), o latão foi estocado à 3⁰C por 15 dias,

de onde foram retiradas alíquotas nos dias de estocagem 1, 4, 7, 10, 13 e 15 para análises microbiológicas. (Figura 2.1).

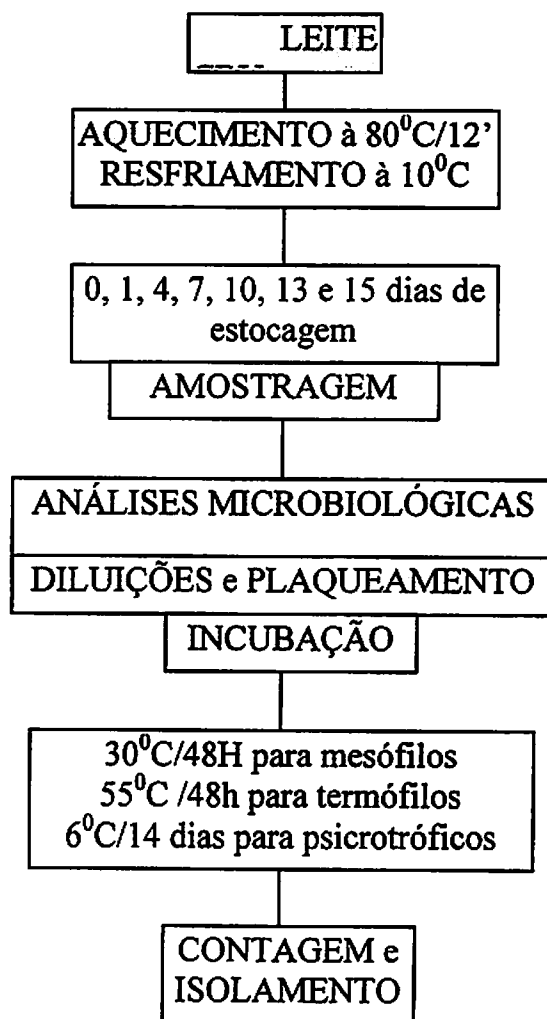


FIGURA 2.1: Esquema das análises no leite aquecido

2.2.3- Análises microbiológicas

Foram utilizados os métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Marshall, 1992).

2.2.3.1- Contagem total

Após feita diluição das amostras em água peptonada 0,1%, foram retirados 0,1 ml para semeadura em superfície, realizada em triplicata, utilizando meio padrão para contagem (PCA - Merck). As placas foram incubadas à 30^oC por 48 horas para contagem de microrganismos mesófilos, à 55^oC para contagem de microrganismos termófilos e a 6^oC por 14 dias para contagem de microrganismos psicotróficos.

Após os devidos períodos de incubação foram realizadas as contagens e retiradas colônias para estudo através da coloração de Gram, aspectos morfológicos e coloração de esporos (Ribeiro e Soares, 1993), assim como verificação das atividades lipolíticas e proteolíticas. As colônias retiradas foram repicadas em PCA inclinado e mantidas viáveis pela adição de óleo mineral.

2.2.3.2- Verificação da atividade proteolítica e lipolítica

Para verificação da proteólise empregou-se placas com meio ágar-leite desnatado, preparado com leite em pó desnatado reconstituído em PCA na proporção de 1%.

Na verificação da lipólise empregou-se placas com meio ágar-tributirina, também preparado com PCA acrescido de 1% de tributirina.

As colônias eram estriadas na superfície e após incubação à 37^oC/ 24-48 h verificava-se a presença de halo transparente ao redor das mesmas. A dimensão do halo indicava a intensidade de reação. Os resultados foram assim expressos: halo de 1 mm - fracamente positivo, halo > 1 a 2 mm - positivo (+), halo > 2 a 4 mm - positivo (++) e halo > 4 mm -positivo (+++).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1- Aspectos gerais da qualidade microbiológica do leite aquecido à 80°C/12 minutos

Os dados referentes às contagens totais de microrganismos mesófilos, termófilos e psicrotróficos estão apresentados na figura 2.2.

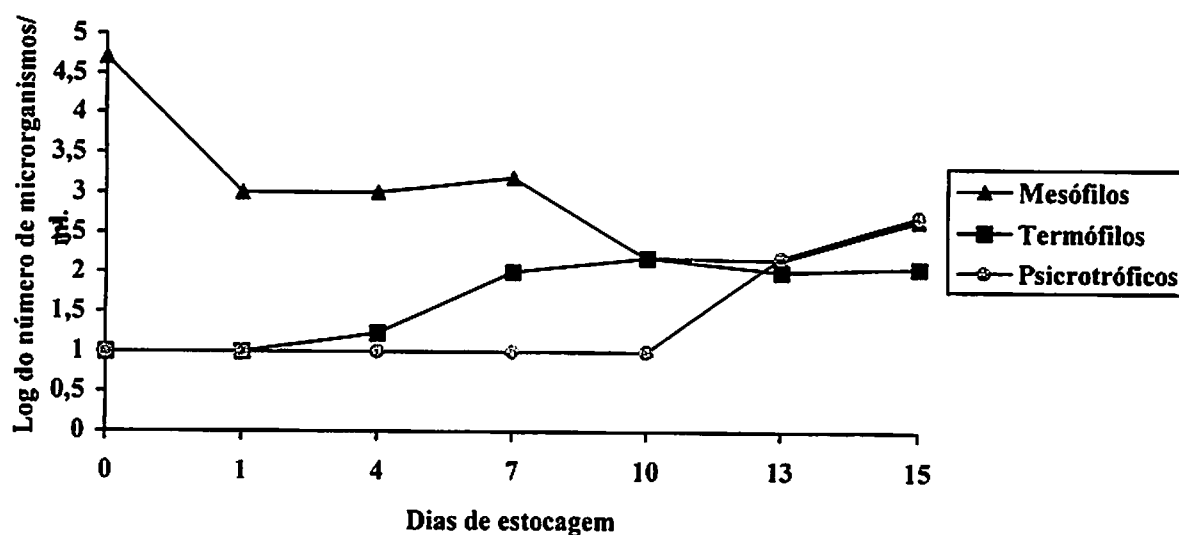


FIGURA 2.2: Log do número de microrganismos isolados no leite aquecido.

Os valores iniciais obtidos após o tratamento térmico do leite tipo B, estão relacionados com a qualidade microbiológica do leite cru, sendo que a análise desse leite cru apresentou contagens bacterianas iniciais de $1,8 \times 10^6$ ufc/ml para mesófilos, $1,0 \times 10^1$ ufc/ml para termófilos e $2,7 \times 10^4$ ufc/ml para psicrotróficos (Cap. 1).

Os microrganismos psicrotróficos foram enumerados na ordem de 10^1 a 10^2 ufc/ml conforme dados apresentados no figura 2.2. Normalmente eles só são encontrados em leites tratados termicamente como contaminantes pós-tratamento, visto que a maioria é destruída por tratamentos térmicos como a pasteurização. De acordo com dados de Schroder e Bland (1984) essas bactérias podem ser destruídas pelo tratamento térmico quando presentes em números baixos, como 10^2 ufc/ml, mas podem sobreviver quando as contagens estiverem próximas a 10^6 ufc/ml. Este fato pode ser confirmado pela análise do leite em estado cru, que apresentou contagens de mesófilos variando na ordem de 10^6 a 10^9 ufc/ml e contagens de psicrotróficos variando na ordem de 10^4 a 10^8 ufc/ml. Como os materiais utilizados na coleta da amostra e durante o tratamento térmico foram devidamente esterilizados e mantidos fechados, pode-se concluir que a presença dos microrganismos é consequência da sobrevivência ao tratamento empregado, devido aos altos números apresentados pela amostra "in natura". Portanto, é importante manter baixo o número de microrganismos em produtos a serem tratados termicamente; quanto menor o número de contaminantes em um produto cru, menores serão as chances de se detectar microrganismos viáveis depois do tratamento térmico. Citações de Alfenas (1994) enfatizam que o controle de qualidade deve evitar a contaminação do leite por psicrotróficos e restringir seu crescimento, evitando que alcancem níveis maiores que 10^4 a 10^5 ufc/ml.

Os valores obtidos para os microrganismos mesófilos decresceram na ordem de 10^4 a 10^2 ufc/ml (figura 2.2). A contagem efetuada no leite cru, mostrou uma população na ordem de 10^6 ufc/ml (Cap 1), indicando higienização incorreta do produto. Devido a uma população fora dos padrões estabelecidos para leite tipo B, a sobrevivência de bactérias mesófilas termorresistentes é confirmada pelos valores obtidos nas análises. Os trabalhos de Martin (1981) demonstraram grande interesse nesse grupo de microrganismos que sobrevivem a tratamentos térmicos, devido as propriedades termodúricas e formação de esporos apresentadas pelo grupo mesofilico. Seus resultados revelaram que a flora microbiana do leite pasteurizado comercialmente consistia de 84% de microrganismos do gênero *Bacillus*. Esses microrganismos que sobreviveram ao aquecimento empregado são, na sua maioria, formadores

decréscimo apresentado ao longo da estocagem refrigerada pode ser devido ao efeito da temperatura de refrigeração sobre os microrganismos. Segundo Jay (1994), à medida que a temperatura é reduzida, abaixo da temperatura ótima de crescimento, há uma queda nas taxas metabólicas dos microrganismos.

A presença de microrganismos termófilos foi constatada com valores variando na ordem de 10^1 a 10^2 ufc/ml (figura 2.2). O pequeno aumento ocorrido foi devido a sobrevivência desses microrganismos ao tratamento térmico empregado, continuando sua multiplicação, embora lentamente, sob refrigeração. Estes dados salientam a importância dos microrganismos esporulados e servem também para ressaltar o seu papel na indústria láctea, onde podem representar problemas quando o leite ou seus produtos ficam expostos à temperaturas inadequadas para estocagem. Durante a fase que antecedeu a coleta da amostra, verificando o sistema de entrega dos latões de leite no laticínio, foi notado que muitos produtores não refrigeraram o leite após a ordenha e ainda permitem que a sua permanência à temperatura ambiente, expostos ao calor solar até a entrega no laticínio. O tempo de permanência desse leite à alta temperatura juntamente com as falhas de higienização durante a obtenção do produto, tornam o ambiente propício para a contaminação e posterior desenvolvimento dos microrganismos termófilos. Chopra e Mathur (1984) também verificaram a presença de microrganismos termófilos em leites e derivados devido a permanência em temperaturas inadequadas de estocagem.

2.3.2- Grupos microbianos isolados

A classificação foi feita baseada na coloração de Gram, forma e arranjo desses microrganismos. A presença de esporos, através de coloração específica também foi verificada. A tabelas 2.1 mostra os resultados obtidos na classificação dos microrganismos isolados no leite aquecido.

TABELA 2.1: Porcentagem do número de bactérias psicrotróficas, mesófilas e termófilas isolados no leite aquecido

GRUPOS MICROBIANOS	Psicrotróficos		Mesófilos		Termófilos	
	N ^o cols.	%	N ^o cols.	%	N ^o cols.	%
Gram positivos	0	0	22	53,7	19	95
Gram negativos	20	100	9	21,9	0	0
Cocos	0	0	7	17,11	0	0
Bacilos Gram positivos esporulados	0	0	14	34,1	19	95
Bacilos Gram positivos sem esporos	0	0	1	2,44	0	0
Bacilos Gram negativos	20	100	9	21,95	0	0
Perdas	0		10	24,4	1	5
Total	20	100	41	100	20	100

No grupo de microrganismos psicrotróficos foram caracterizados 20 microrganismos, sendo 100% como bacilos Gram negativos. Esses bacilos Gram negativos são considerados como os microrganismos mais envolvidos na deterioração de produtos lácteos mantidos sob refrigeração. A presença desses microrganismos no leite aquecido pode ser devido a sobrevivência ao tratamento empregado como consequência das altas contagens apresentadas pelo leite cru (em torno de 10^4 ufc/ml). Além disso, por serem bactérias tipicamente psicrotróficas, a estocagem refrigerada do leite aquecido pode ter influenciado na seleção desses microrganismos. Segundo Gomes (1988), a estocagem refrigerada provoca uma seleção bacteriana, favorecendo a proliferação de bactérias Gram negativas, inicialmente presentes em pequenos números.

Na figura 2.2, pode-se notar que o número de microrganismos psicrotróficos, do dia 0 ao 10^o dia de estocagem permaneceu constante e baixo, dificultando o isolamento desses microrganismos para estudos devido a ausência de crescimento no meio empregado (PCA). No 13^o e 15^o dia o número de bactérias presentes aumentou, sendo que o tempo transcorrido sob refrigeração pode ter favorecido a recuperação das células lesadas pelo tratamento térmico empregado, permitindo assim sua sobrevivência e posterior isolamento.

Foram isoladas 41 colônias no grupo de microrganismos mesófilos, sendo 53,7% Gram positivas e 21,9% Gram negativas. O predomínio de bactérias Gram positivas é confirmado por Jay (1994).

Com relação as bactérias Gram positivas, 34,1% eram bacilos, sendo que apenas 2,44% não apresentou esporos e 17,11% eram cocos..

Quanto as bactérias Gram negativas, todas eram bacilos. Essas bactérias provavelmente sobreviveram ao tratamento térmico empregado devido aos altos números apresentados pelo leite cru. Há ainda a possibilidade de proteção desses microrganismos Gram negativos pela camada superficial (rica em lipídeos) formada durante o aquecimento do leite. Segundo Frazier e Westoff (1993), a nata formada durante o aquecimento do leite pode funcionar como protetor para determinados tipos de microrganismos de constituição mais lipídica, como é o caso das bactérias Gram negativas.

Do total de bactérias termófilas isoladas, 95% foram classificadas como bacilos formadores de esporos. Os estudos realizados mostraram que esses bacilos foram capazes de sobreviver ao tratamento térmico empregado por serem termodúricos e esporogênicos. Brown (1994) cita que a resistência térmica dos esporos de microrganismos termófilos é maior que a de microrganismos mesófilos, além de apresentarem altos índices de sobrevivência ao calor úmido.

Chopra e Mathur (1984) também verificaram predomínio de bacilos Gram positivos esporulados sobrevivendo aos tratamentos térmicos realizados em seus estudos. Os autores testaram a capacidade de sobrevivência desses organismos à temperaturas de 55^o, 60^o, 75^o, 80^o e 90^{oC} por 10 minutos e constataram que a capacidade de sobrevivência era uma característica desse grupo de microrganismos esporogênicos.

2.3.3- Avaliação das propriedades lipolíticas e proteolíticas

As Figuras 2.3, 2.4, e 2.5 mostram as porcentagens dessas atividades proteolíticas e lipolíticas dos grupos de microrganismos isolados no leite aquecido.

Todas as colônias de psicrotróficos isoladas no leite aquecido apresentaram-se 100% proteolíticas e lipolíticas. A Figura 2.3 mostra as porcentagens de atividades exibidas pelos psicrotróficos.

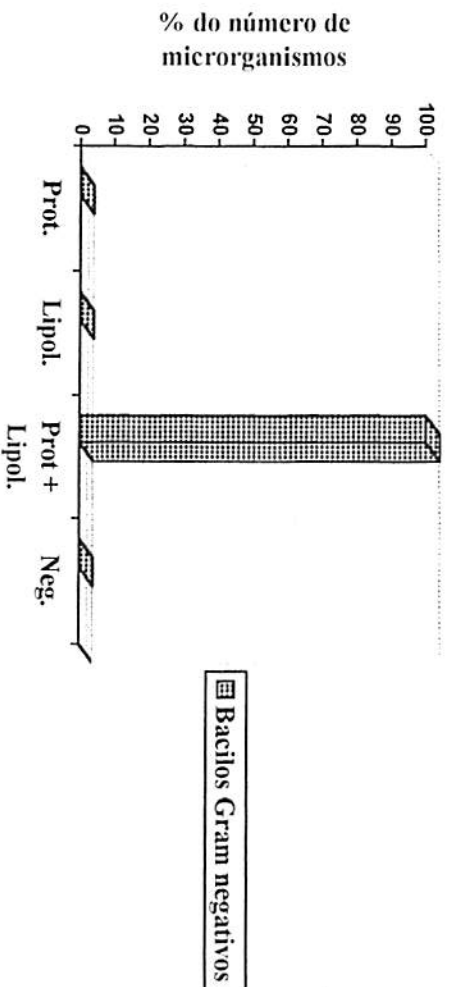


FIGURA 2.3: Porcentagem do número de microrganismos psicrotróficos envolvidos em atividades proteolíticas e lipolíticas no leite aquecido

Como observado anteriormente (item 2.3.2), esses microrganismos são bacilos Gram negativos. Esses resultados são similares aos encontrados por Griffiths (1990); o autor relata a presença de em leite tratado termicamente, de bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos, catalase e oxidase positivas e associa esses bacilos com a proteólise e lipólise de leites e derivados mantidos sob refrigeração. As enzimas (lipases e proteases) produzidas por esses microrganismos, mesmo em baixas concentrações, são capazes de degradar a gordura e a proteína, causando respectivamente, sabor de ranço e amargo no leite estocado sob refrigeração.

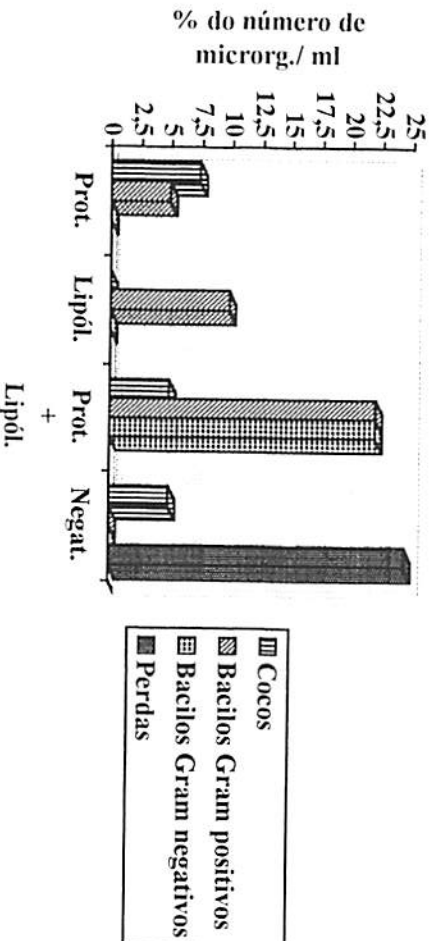


FIGURA 2.4: Porcentagem do número de microrganismos mesófilos envolvidos em atividades proteolíticas e lipolíticas no leite aquecido.

De acordo com o item 2.3.2, no grupo de mesófilos houve um predomínio de bacilos Gram positivos. Analisando a figura 2.4 e as atividades isoladamente, observa-se uma maior atividade lipolítica desses microrganismos (9,75%) contra 4,88% de proteólise; porém deve-se considerar que a maioria dos bacilos apresentaram atividades associadas de proteólise e lipólise (21,95%) e ambas com a mesma intensidade de reação (+ a ++ de positividade).

Dentre os bacilos Gram negativos 21,95% apresentaram atividades associadas de proteólise e lipólise e 4,88% dos cocos isolados também apresentaram este tipo de atividade.

Foram isolados 20 bacilos no grupo termófilo, todos esporulados e mostraram-se mais proteolíticos do que lipolíticos; 8 bacilos apresentaram atividades isoladas de proteólise representando 40% da atividade no grupo e apenas 1 bacilo apresentou atividade lipolítica isolada (5%). A maioria deles (10) apresentaram atividades conjuntas de proteólise e lipólise, representando 50% no total das atividades. A figura 2.5 mostra a porcentagem do número de microrganismos.

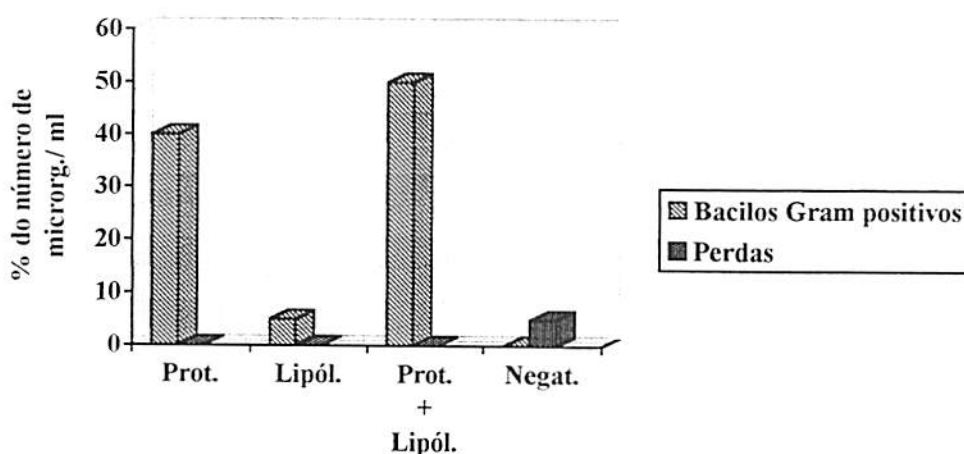


FIGURA 2.5: Porcentagem do número de microrganismos termófilos envolvidos em atividades proteolíticas e lipolíticas no leite aquecido

Além das enzimas proteolíticas dos microrganismos, a proteína do leite pode ter sofrido ação do aquecimento empregado. De acordo com as revisões de Gomes (1996), o aquecimento à 80°C aumenta a velocidade de hidrólise da caseína, devido a um rearranjo da estrutura micelar que não é reversível com o resfriamento. A proteólise durante a estocagem do leite aquecido parece estar relacionada com o processo de aquecimento e com o teor de matéria graxa. Na verificação

da ação associada de proteólise e lipólise no leite aquecido, levantou-se a suspeita de que possa ter havido um relacionamento entre a caseína e a matéria graxa do leite. Este fato também foi relatado por Lopes-Fandino et al. (1993). Segundo os autores, a degradação da caseína está diretamente relacionada com o teor de matéria graxa do leite, existindo maior atividade proteolítica no leite desnatado durante o armazenamento refrigerado.

As figuras 2.6 e 2.7 ilustram as reações de proteólise e lipólise citadas. As intensidades das reações citadas referem-se aos halos produzidos ao redor das colônias.



FIGURA 2.6: Verificação da reação de proteólise: halos apresentados pelos microrganismos mesófilos em ágar leite desnatado.

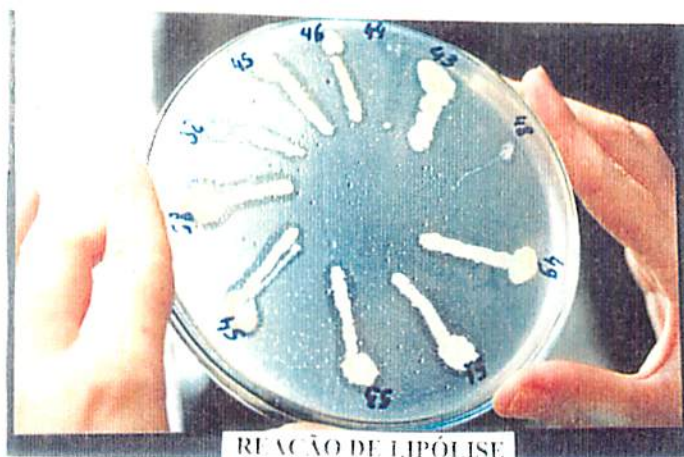


FIGURA 2.7: Verificação da reação de lipólise: halos apresentados pelos microrganismos mesófilos em ágar tributirina.

2.4 CONCLUSÃO

O tratamento térmico à 80⁰C/12 min foi realizado objetivando destruir as células vegetativas e favorecer a produção de esporos; assim sendo a presença de bactérias Gram negativas está relacionada com a carga microbiana do leite cru. Os estudos mostraram que essas bactérias são capazes de sobreviver à tratamentos térmicos como o empregado, quando presentes em números acima de 10⁶UFC/ml, fato esse ocorrido neste trabalho.

Na avaliação da presença de microrganismos mesófilos e termófilos notou-se uma queda na quantidade apresentada desses microrganismos no decorrer da estocagem refrigerada. O uso da refrigeração, com a temperatura abaixo da ótima de crescimento para esses microrganismos mesófilos e termófilos, causou uma queda nas atividades metabólicas desses microrganismos. Essa queda também pode ter sido intensificada pela competição com os psicrotróficos que sobreviveram ao tratamento térmico e foram restabelecendo suas atividades ao longo da estocagem.

Com relação às atividades enzimáticas dos grupos microbianos estudados, pode-se afirmar que quase todos os microrganismos isolados apresentaram atividades enzimáticas. A mais marcante foi encontrada no grupo psicrotrófico, onde todos os seus representantes mostraram atividades tanto proteolíticas como lipolíticas, com intensidades de reações variando, em sua maioria, em ++ a +++ de positividade.

Os microrganismos mesófilos apresentaram uma flora bem diversificada (cocos, bacilos Gram positivos e bacilos Gram negativos). Todos esses microrganismos exibiram propriedades proteolíticas e lipolíticas tanto isoladas como conjuntas.

Os microrganismos esporulados do grupo termófilo mostraram-se mais proteolíticos do que lipolíticos, embora tenham apresentado reações conjuntas de proteólise e lipólise. A intensidade da reação proteolítica esteve relacionada com o aquecimento do leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, R. C. G. **Efeito da temperatura no crescimento e determinação dos parâmetros de resistência ao calor de psicrotrófico acidificante isolado do leite.** Viçosa: UFV, 1994. 55p. (Tese - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- BROWN, K. L. Spore resistance and ultra heat treatment processes. **Journal of Applied Bacteriology**, Normay, v.76, n.23, p.49-60, Nov. 1994. (Suppl. symposium).
- CHOPRA, A.K.; MATHUR, D.K. Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.57, n.2, p.263-271, Feb. 1984.
- FEIJOO, S.; BODYFELT, F. W. A rapid method for determining proteases of heat resistant *Bacilli* in raw milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.24-27, p.101, June. 1990. (Supplement).
- FRAZIER, W. C.; WESTOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos.** Zaragoza: Acríbia, 1993. 681p.
- GRIFFITHS, M. W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp present in milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.9, p.790-792, Sept. 1990.
- GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana.** Piracicaba: ESALQ, 1988. 85p. (Tese - Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado "Longa-vida".** Campinas: UNICAMP, 1996. 108p. (Tese - Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos.** 3.ed. Zaragoza: Acríbia. 1994. 804p.

- KROLL, R. G.; RODRIGUES, V. M. Production of keeping quality of pasteurized milk by detection of citochrome c oxidase. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.60, n.1, p.21-27, Jan. 1986.
- LARSEN, H. D.; JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, Elsevier, v.34, n.2, p.179-186, Feb. 1997.
- LOPEZ-FANDINO, R.; OLANO, A.; SAN JOSÉ, C.; RAMOS, M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.60, n.3, p.339-347, Mar. 1993.
- MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 416p.
- MARTIN, J. H. Symposium: heat resistant microorganisms in dairy food system. Heat resistant mesophilic microorganisms. **Journal Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.1, p.149-156, Jan. 1981.
- MEER, R. R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.12, p.969-979, Dec. 1991.
- MIKOLAJCIK, E. M.; SIMON, N. T. Heat resistant psychrotrophic bacteria in raw milk and their growth at 7 degree. **Journal of Food Protection**, Ames, v.41, n.2, p.93-95. Feb. 1978.
- RAVANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.20, n.3, p.164-167, Mar. 1995.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual - bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112p.
- SETLOW, P. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. **Journal of Applied Bacteriology**, Normay, v.76, n.23, p.49-60, Dec. 1994. (Supplement Symposium).
- SCHRODER, M. J. A.; BLAND, M. A. Effect of pasteurization temperature on the keeping quality of whole milk. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.51, n.4, p.569-578, Apr. 1984.

CAPITULO 3
MICROORGANISMOS EM LEITE TIPO B CRU E AQUECIDO ESTOCADO SOB
REFRIGERAÇÃO

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar os microrganismos isolados de leite tipo B cru e aquecido à 80°C/ 12 minutos, mantidos sob refrigeração por 15 dias. Foram isolados 179 colônias do leite cru sendo, 80 psicrotróficas, 80 mesófilas e 19 termófilas. No leite aquecido foram isoladas 70 colônias sendo, 20 psicrotróficas, 31 mesófilas e 19 termófilas. No grupo psicrotrófico, tanto do leite cru quanto do aquecido, houve predomínio de bactérias Gram negativas. O grupo mesófilo apresentou predomínio de bactérias Gram positivas não esporuladas no leite cru e bactérias Gram positivas esporuladas no leite aquecido. Essas bactérias Gram positivas esporuladas também predominaram no grupo termófilo dos 2 tipos de leite em estudo. Os microrganismos Gram negativos do leite cru foram caracterizados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* (79,3% da flora Gram negativa do leite cru), *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pasteurella* e *Acinetobacter*. Entre *Pseudomonas* as espécies predominantes foram *Ps.fluorescens* e *Ps. putida*. No leite aquecido os microrganismos Gram negativos foram caracterizados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* (89,6% da flora Gram negativa do leite aquecido) e *Serratia*. A espécie de *Pseudomonas* mais encontrada no leite aquecido foi *Ps. putida*. A flora Gram positiva dos leites foi caracterizada por bacilos e cocos. Os bacilos Gram positivos representaram o segundo grupo mais envolvido na deterioração do leite cru e o primeiro no leite aquecido, sendo que o predomínio de esporulados do gênero *Bacillus* foi constatado tanto no leite cru como no aquecido. As espécies de *Bacillus* mais frequentemente identificadas foram: *B. licheniformis* e *B.coagulans* tanto no leite cru quanto no aquecido. Entre as bactérias isoladas no leite cru, destacou-se a grande quantidade de bactérias psicrotróficas do gênero *Pseudomonas*, também presentes no grupo mesófilo. No leite aquecido o destaque é dado aos microrganismos do gênero *Bacillus*, que se apresentaram dominantes no grupo mesófilo e termófilo.

ABSTRACT

MICROORGANISMS IN RAW AND HEATED TYPE B MILK, STORED UNDER REFRIGERATION

The aim of this study was to characterize and identify the microorganisms isolated from raw type B milk, raw and heated (80°C for 12 minutes), refrigerated stored for 15 days. From the raw milk, 179 colonies were isolated, being, 80 mesophilics, 80 psychrotrophics and 19 thermophilics. From the heated milk, 70 colonies were isolated, being, 20 psychrotrophics, 31 mesophilics and 19 thermophilics. There was a predominance of gram negative bacteria in both treatments in the psychrotrophic groups. The mesophilic group occurred a predominance of gram positive bacteria, non-sporulated for the raw and sporulated for the heated milk. These bacteria were also predominant in the thermophilic group in both treatment. Gram negatives in the raw milk belonged to the genus *Pseudomonas* (79,3% of the gram negative bacteria of the raw milk), *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pasteurella* e *Acinetobacter*. *Ps. fluorescens* and *Ps putida*, were predominant among *Pseudomonas*. In the heated milk the gram negative microorganisms were characterized as *Pseudomonas* (89,6% of the total gram negative) and *Serratia*, being the *Ps. putida* the one found in higher number. The gram positive microorganisms of the milk was characterized as being bacillus and cocos. The gram positive bacillus represented the first group more involved in the spoilage of the heated milk and the second group for the raw milk. Sporulated of the genus *Bacillus* was predominant for both milks. The *Bacillus* species more frequently identified were: *B. licheniformis* and *B. coagulans* in both milks. Among the isolated bacteria for raw milk, psychrotrophics of the genus *Pseudomonas* was present in very high number, they were presented in the mesophilic group as well. For the heated milk, the genus *Bacillus* presented the highest counting for both groups, mesophilic and thermophilic.

3.1 INTRODUÇÃO

O leite, por ser um alimento com alto teor de umidade e rico em nutrientes, é um excelente meio de cultivo, contendo uma microbiota complexa e numerosa, dependente de uma série de fatores, tais como: cuidados tomados na ordenha, limpeza e manuseio de utensílios, higienização do animal, do ordenhador e do estábulo, condições de saúde do animal e do ordenhador, condições de transporte, etc (Martin, 1993).

Os gêneros de microrganismos mais comumente encontrados no leite cru, quer sejam patogênicos ou não, são: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Brucella* e os coliformes (Jay, 1994).

O leite pasteurizado, apesar de ser submetido a tratamento térmico, continua sendo um meio adequado para o desenvolvimento de microrganismos, pois a pasteurização embora cause destruição das células vegetativas, permite a sobrevivência e conseqüente multiplicação de outros microrganismos termorresistentes (Thielmann, 1995). Segundo Phillips e Griffiths (1986), os tipos de microrganismos presentes no leite pasteurizado variam de acordo com a temperatura de estocagem e a qualidade do leite cru.

Segundo Robinson (1987), as bactérias termodúricas mais comuns no leite incluem: *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*. As bactérias termodúricas psicrótróficas, são capazes de sobreviver à pasteurização e crescer a baixas temperaturas, causando problemas para a indústria como causadoras de deterioração.

Verificando a flora de leite pasteurizado estocado à 5 - 7°C, Ternström, Lindberg e Molin (1993) encontrou um terço das amostras deterioradas por bacilos Gram positivos formadores de esporos. Do mesmo modo, Cromie, Dommett e Schmidt (1989) observaram que todos os isolados

obtidos de amostras de leite deteriorado, estocadas a 3 a 7^oC, eram psicrotróficos aeróbios, identificados como *Bacillus*, e a espécie mais encontrada foi *B. circulans*. Coghill e Juffs (1979), também isolaram psicrotróficos esporulados, pertencentes ao gênero *Bacillus* em amostras de leite cru e pasteurizado em laboratório, com incidência de 16,7% e 23,3%, respectivamente. Como o número de esporos no leite cru foi menor do que no pasteurizado, concluíram que a sua presença em leite pasteurizado tenha ocorrido pela germinação dos esporos, devido ao tratamento térmico e contaminação dos equipamentos.

No Brasil, em estudos realizados em amostras de leite cru, coletadas em fazendas e submetidas à pasteurização lenta e rápida em laboratório, mostraram que os principais microrganismos resistentes ao tratamento térmico pertenciam aos gêneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* (citações de Thielman,1995). Em algumas amostras submetidas à pasteurização rápida, foram encontrados microrganismos dos gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*, indicando contaminação pós-processamento.

Arthrobacter e outras espécies Gram positivas, como certos *Streptococcus*, também tem sido considerados como componentes da microflora psicrotrófica, embora sejam também termodúricos (Robinson,1987).

Para Robinson (1987), os psicrotróficos Gram negativos mais comumente encontrados no leite são bacilos curtos, não esporulados, oxidase positiva e, a maioria deles, pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* e coliformes.

As bactérias psicrotróficas que contaminam o leite sob refrigeração, muitas das quais pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, causam problemas no leite cru estocados por longos períodos, tornando o produto inaceitável para o consumo, em virtude da produção de odores e sabores desagradáveis. De acordo com Ternstron, Lindberg e Molin (1993), praticamente todo o leite pasteurizado e produtos derivados dele, mantidos sob refrigeração, eventualmente desenvolvem alterações de "flavour" como sabor amargo ou pútrido, sabor de ranço e sabor de fruta.

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar os microrganismos isolados do leite tipo B cru e aquecido à 80^oC, estocado sob refrigeração por 15 dias.

3.2- MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, MG.

3.2.1- Coleta e tratamento da amostra

O leite cru tipo B foi coletado nos tanques refrigerados dos caminhões de transporte de uma cooperativa local.

Foram coletados 20 litros de leite cru tipo B em vasilhames tipo “latão de leite” devidamente esterilizados e mantidos hermeticamente fechados. Após a coleta, os latões foram transportados sob refrigeração, em caixas de isopor contendo gelo picado, ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, MG.

No laboratório, os latões foram rotulados e homogeneizados. Do latão 1, contendo leite cru, foram retiradas alíquotas para análises microbiológicas nos dias 0, 1, 3, 5, 8, 10, 13 e 15 de estocagem em câmara fria à 3^oC por 15 dias.

A amostra do latão 2 foi dividida em beckers de 2000 ml (Pirex) para o tratamento térmico. Os beckers foram colocados em banho-maria (Quimis) com sistema de água circulante, regulado para aquecimento à 80^oC. Quando o leite atingiu a temperatura desejada (80^oC) foi maracado o tempo de 12 minutos (Mikolajick e Simon, 1978), sendo as amostras homogeneizadas com auxílio de bastão de vidro esterilizado, em intervalos de aproximadamente 3 minutos. Terminado o tempo, a amostra foi transferida para um novo latão previamente esterilizado e resfriada à 10^oC em banho de gelo. Após a retirada para de uma alíquota para as análises microbiológicas iniciais, o latão foi estocado em câmara fria à 3^oC por 15 dias, de onde foram retiradas alíquotas para análises nos dias 1, 4, 7, 10, 13 e 15 de estocagem.

3.2.2- Meio de cultura empregado

Utilizou-se o Plate Count Agar (Merck) em todas as fases do estudo. Esse meio, apesar de não ser considerado rico em substratos, supre adequadamente as necessidades das bactérias em estudo. Esse trabalho não visou o estudo das bactérias do grupo láctico, o estudo ficou voltado para os contaminantes da amostra “in natura”, os microrganismos sobreviventes ao tratamento empregado (80⁰C/12minutos), assim como os psicrotróficos.

3.2.3- Obtenção e isolamento das colônias

As colônias utilizadas foram retiradas de leite tipo B, cru e aquecido à 80⁰C, estocado sob refrigeração por 15 dias. As amostras foram plaqueadas em PCA (Merck) e incubadas à 6⁰C/14 dias para isolamento de microrganismos psicrotróficos, 30⁰C/ 48h para mesófilos e 55⁰C/ 48h para termófilos. Após os períodos de incubação, retirou-se colônias isoladas que foram transferidas assepticamente para tubos de ensaio contendo PCA(Merck) inclinado. Os tubos foram incubados por 24 horas à 30⁰C para os microrganismos mesófilos e psicrotróficos e à 37⁰ e 55⁰C para os microrganismos termófilos

3.2.4- Purificação das colônias isoladas

A purificação das colônias foi realizada pelo método de estrias de esgotamento em PCA e incubação por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, a pureza da colônia era checada através de exames macro e microscópicos, através de esfregaços para coloração de Gram. Os esfregaços que apresentaram colônias com morfologias e colorações diferentes eram novamente purificados.

3.2.5- Preservação das colônias isoladas

Após a confirmação da pureza, as colônias eram mantidas viáveis em PCA inclinado, cobertas com óleo mineral estéril e mantidas sob refrigeração, de onde periodicamente eram retiradas para reativação e aplicação de testes utilizados na identificação das mesmas.

3.2.6- Caracterização preliminar das colônias

A caracterização das colônias foi realizada com base nos resultados da verificação das características de crescimento em PCA, assim como na determinação da morfologia, arranjo, tamanho, coloração e também verificação da presença ou produção de esporos através da coloração de esporos (Ribeiro e Soares, 1993). As colônias também foram submetidas aos testes de catalase, oxidase e reação em Triple Sugar Iron Agar (TSI).

Para verificação do crescimento em meio sólido, foram observadas as características (de acordo com descrições de Bergey's, 1984, 1986 e 1994): forma, superfície, bordas, elevação e pigmentação (quando presentes).

As características de morfologia e arranjo celular, foram verificadas em esfregaços fixados ao fogo, a partir de cultura de 24 horas, corados pelo método de Gram.

Nas colônias isoladas foram feitas provas preliminares de identificação como, catalase (Sneath et al., 1986) e oxidase (Macfaddin, 1980).

A figura 3.1 mostra o esquema de classificação dos microrganismos isolados

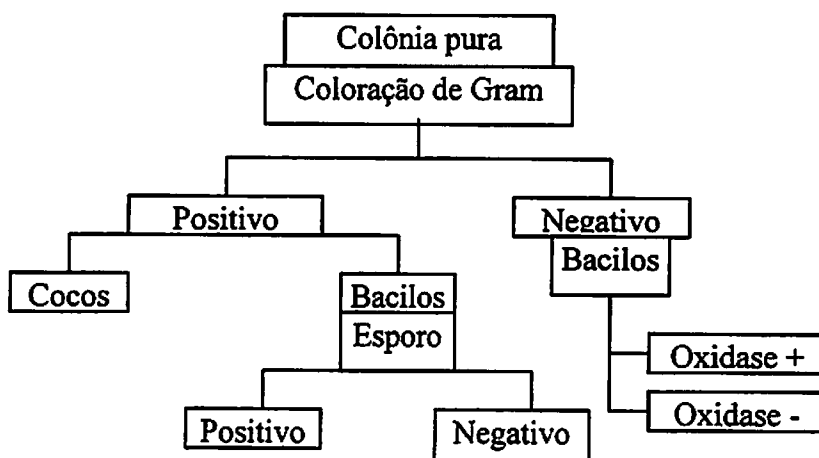


FIGURA 3.1: Esquema seguido para identificação dos microrganismos em estudo

3.2.7- Identificação dos microrganismos

As técnicas e interpretações dos testes bioquímicos seguiram instruções de Macfaddin (1980). As provas bioquímicas foram escolhidas de acordo com tabelas, utilizadas para

identificação de microrganismos, propostas por Macfaddin (1980) e Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1984, 1986 e 1994), assim como os resultados obtidos.

Os microrganismos isolados do leite foram caracterizados como cocos Gram positivos, Catalase positiva; cocos Gram positivos catalase negativa; bacilos Gram positivos esporulados; bacilos Gram positivos sem esporos; bacilos Gram negativos oxidase positiva e bacilos Gram negativos oxidase negativa.

A identificação foi realizada, sempre que possível, a nível de gêneros e espécies.

3.2.7.1- Cocos Gram positivos, catalase positiva

Para identificação dos microrganismos foram realizadas as provas: Oxidase; Redução do nitrato; Motilidade; O-F glicose; Crescimento em NaCl à 5%, 10% e 15%; Fermentação de glicose em aerobiose e anaerobiose; Fermentação de manitol em aerobiose e anaerobiose; Coagulase (em tubo); Liquefação de gelatina à 22^oC; Arginina dehidrolase; H₂S; Voges-Proskauer e DNase.

3.2.7.2- Cocos Gram positivos, catalase e oxidase negativas

Foram identificados através das provas: Verificação de hemólise em ágar sangue à 5%; Crescimento a pH 9,6; Crescimento em NaCl a 6,5%; Verificação de crescimento em incubação à 10^oC e 45^oC; Fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, manitol, sorbitol e arabinose; Liquefação de gelatina à 22^oC; Arginina dehidrolase e Redução de nitrato.

3.2.7.3- Bacilos Gram positivos formadores de esporos

Foram caracterizados pelas provas: Motilidade à 37^oC; Redução do nitrato, O-F glicose; Indol; Liquefação de gelatina à 22^oC; Citrato de Simmons; Voges-Proskauer; Uréia, Fenilalanina

desaminase; Fermentação de carboidratos (glicose, manitol, arabinose e xilose); Crescimento em NaCl a 7,5% e Hidrólise de amido.

3.2.7.4- Bacilos Gram positivos não formadores de esporos

Foram caracterizados pelas provas: Verificação de hemólise em ágar sangue a 5%; O-F glicose; Redução do nitrato; Motilidade à 22^oC; Fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, maltose, salicina, manitol, trealose e xilose); Voges-Proskauer; Liquefação de gelatina à 22^oC; Uréia; Arginina dehidrolase e produção de H₂S.

3.2.7.5- Bacilos Gram negativos, catalase positiva e oxidase positiva

Após a classificação preliminar (catalase, oxidase e reação em TSI), culturas de 24 horas foram inoculadas nas galérias do sistema Bac-tray III (Difco), para identificação através de sistema de códigos. Os testes realizados foram: Cetrimide; Acetamida; Malonato; Citrato; Maltose; Esculina; Arginina dehidrolase; Uréia e Indol. Após incubação por 18 a 24 horas, realizava-se as leituras e o resultado dos códigos dos testes positivos eram analisados pelo manual, conforme instruções do fabricante.

3.2.7.6- Bacilos Gram negativos, catalase positiva e oxidase negativa

Assim como os bacilos oxidase positiva, esse grupo de microrganismos também foi identificado pelo sistema Bac-tray, sendo utilizados os sistemas I e II. As provas realizadas foram: ONPG; Arginina dehidrolase; Lisina descarboxilase; Ornitina descarboxilase; H₂S; Uréia, VP (Voges-Proskauer); Fenilalanina; Indol e Citrato de Simmons - Bactray I.

No Bac-tray II foram realizadas as provas de fermentação de carboidratos: Malonato; Ramnose; Adonitol; Salicina; Arabinose; Inositol; Sorbitol; Sacarose; Manitol e Rafinose.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do meio de cultivo utilizado no presente trabalho (PCA -Merck) foram obtidas 249 colônias provenientes de leite tipo B cru e aquecido à 80⁰C, sendo 179 colônias do leite cru e 70 do leite aquecido. A tabela 3.1 mostra a distribuição dos microrganismos nos leites analisados, caracterizados preliminarmente pela coloração de Gram e de esporos.

TABELA 3.1: Relação dos microrganismos isolados de acordo com a temperatura de incubação e características preliminares.

Grupo microbiano	Cols. retiradas	Gram positivos esporulados		Gram positivos não esporulados		Gram negativos	
		N ⁰ cols	%	N ⁰ cols	%	N ⁰ cols	%
LEITE CRU							
PSICOTRÓFICOS	80	12	6,70	4	2,23	64	35,75
MESÓFILOS	80	18	10,05	34	18,99	28	15,65
TERMÓFILOS	19	19	10,61	0		0	
TOTAL	179	49	27,37	38	21,23	92	51,40
LEITE AQUECIDO à 80⁰C/12 min.							
PSICOTRÓFICOS	20	0		0		20	28,6
MESÓFILOS	31	14	20,0	8	11,4	9	12,9
TERMÓFILOS	19	19	27,1	0		0	
TOTAL	70	33	47,1	8	11,4	29	41,5

3.3.1- Estudo da flora do leite cru e aquecido à 80°C

As bactérias Gram negativas foram as mais representativas na deterioração do leite cru (51,40%), sendo que a maior incidência delas ocorreu no grupo psicotrófico (35,75%); essas bactérias também estiveram envolvidas na deterioração do leite aquecido (41,5%). O predomínio de bactérias Gram negativas psicotróficas como deteriorantes de leite cru também foi constatado por Garcia-Armesto et al. (1993); segundo os autores de 204 bactérias psicotróficas isoladas, 103 foram classificadas como bactérias Gram negativas.

Dentre as bactérias Gram positivas, que representaram o segundo grupo mais importante na deterioração do leite cru, destacaram as bactérias não formadoras de esporos (21,23%), sendo que nesse grupo estão incluídas bactérias de potencial toxigênico como *Staphylococcus aureus*.

As bactérias Gram positivas formadoras de esporos representaram o segundo grupo mais importante na deterioração do leite aquecido.

Ternstron, Lindberg e Molin (1993), em estudo da flora deteriorante de leite cru e pasteurizado, também encontraram o predomínio de bactérias Gram negativas envolvidas na deterioração dos 2 tipos de leite (100% no leite cru e 65% no pasteurizado). Segundo os autores, o segundo grupo mais envolvido na deterioração do leite pasteurizado foi o de bactérias Gram positivas esporuladas, representado aproximadamente 33,3% dos isolados em sua pesquisa.

3.3.2- Caracterização dos microrganismos Gram negativos

As bactérias do gênero *Pseudomonas* representaram 79,3% da flora Gram negativa isolada do leite cru e 89,6% do leite aquecido. Esse gênero inclui os microrganismos mais envolvidos na deterioração do leite cru mantido sob refrigeração, principalmente por serem psicotróficas. Os estudos em torno desse gênero datam de longo tempo, sendo que em 1979, Muir, Phillips e Dalglush encontraram 65% a 78% da população psicotrófica do leite cru representada por esse gênero. Kwan e Skura (1985) isolaram 53,1% de bactérias do gênero *Pseudomonas* em leite cru

refrigerado. Os dados obtidos no presente trabalho ajudam a confirmar a importância do predomínio do gênero *Pseudomonas* em produtos lácteos estocados sob refrigeração.

A tabela 3.2 mostra gêneros e espécies encontradas das bactérias Gram negativas isolados do leite cru e aquecido.

TABELA 3.2: Bacilos Gram negativos isolados do leite cru e aquecido

BACILOS GRAM NEGATIVOS		
Microorganismo	Leite cru	Leite aquecido à 80°C
<i>Pseudomonas sp</i>	1	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	35	2
<i>Pseudomonas putida</i>	28	24
<i>Pseudomonas vesiculans</i>	1	0
<i>Pseudomonas cepacia</i>	1	0
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	1	0
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	0
<i>Flavobacterium sp</i>	4	0
<i>Aeromonas sp</i>	2	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0
<i>Pasteurella multocida</i>	1	0
<i>Acinetobacter</i>	5	0
<i>Serratia sp</i>	0	3
Total	92	29

No leite aquecido à 80°C (realizado com intuito de verificar a presença de esporulados), a presença de microrganismos Gram negativos pode estar relacionada com a carga microbiana do leite cru. Segundo Schroder e Bland (1984), essas bactérias Gram negativas são destruídas pela pasteurização, mas há possibilidade de sobrevivência (principalmente bactérias do gênero *Pseudomonas*) quando presentes em populações acima de 10^6 ufc/ml. Os dados referentes as contagens iniciais revelaram números na ordem de 10^6 ufc/ml para os totais de mesófilos e 10^4 ufc/ml para os totais de psicrotróficos (Cap 1); com essa alta carga microbiana pode-se concluir que esses microrganismos sobreviveram ao tratamento térmico empregado, conseguindo

recuperação dos danos celulares causados pelo aquecimento quando foram mantidas sob refrigeração. A tabela 3.1 mostra que dentre as bactérias psicrotróficas isoladas do leite aquecido, todas foram classificadas como Gram negativas.

Estudos realizados por Stevenson et al. (1996) também revelaram presença de bactérias Gram negativas psicrotróficas em leite pasteurizado. Os autores associaram a presença dessas bactérias a uma contagem de pré-incubação (realizada à 6⁰C/5 dias) antes da contagem total. As amostras que apresentaram contagens de pré-incubação > 10⁵ ufc/ml tiveram maior possibilidade de resistência a pasteurização empregada. Eles também sugeriram que a ocorrência desses microrganismos em leite pasteurizado estaria relacionada com uma velocidade de crescimento relativamente alta, e concluíram que algumas linhagens psicrotróficas, principalmente do gênero *Pseudomonas* poderiam sobreviver à pasteurização quando presentes em quantidades acima de 10⁵ ufc/ml.

Dentro do gênero *Pseudomonas* caracterizado no leite cru, destaca-se a *Pseudomonas fluorescens*. Esses dados são confirmados por Ternstron, Lindberg e Molin (1993) que mostraram *Pseudomonas fluorescens* como as principais bactérias Gram negativas envolvidas na deterioração do leite cru.

No leite tratado termicamente houve predomínio de *Pseudomonas putida*. Essa espécie também tem sido encontrada como dominante em leite pasteurizado em outros trabalhos (Ternstron, Lindberg e Molin, 1993; Stevenson et al., 1996).

3.3.3- Caracterização da flora Gram positiva

De acordo com as tabelas 3.3 e 3.4, a flora Gram positiva foi caracterizada por bacilos e cocos.

3.3.3.1- Identificação dos bacilos Gram positivos

Os bacilos Gram positivos representaram o segundo grupo mais importante na deterioração do leite cru e o primeiro no leite aquecido (tabela 3.3), sendo que o predomínio do gênero *Bacillus* foi constatado tanto no leite cru quanto no leite aquecido.

TABELA 3.3: Bacilos Gram positivos isolados no leite cru e aquecido

BACILOS GRAM POSITIVOS		
Microorganismo	Leite cru	Leite aquecido à 80 ^o C
<i>Bacillus sp</i>	14	13
<i>Bacillus polymyxa</i>	1	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	12	10
<i>Bacillus pumilus</i>	4	0
<i>Bacillus cereus</i>	3	0
<i>Bacillus circulans</i>	4	1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1	0
<i>Bacillus coagulans</i>	10	9
<i>Lactobacillus sp</i>	4	0
Bacilos não esporulados	16	1
Total	69	34

Os microrganismos do gênero *Bacillus* por serem capazes de formar esporos que são altamente resistentes ao calor, secagem e outros agentes destrutivos, são de grande interesse na indústria de laticíneos, por sobreviverem a pasteurização. Deve-se ressaltar também as propriedades psicrotróficas desses bacilos, assim como a capacidade de sobrevida e multiplicação a temperaturas relativamente altas. A tabela 3.1 mostrou que todos os isolados no grupo termófilo eram bacilos esporulados. Esses bacilos isolados do leite cru e aquecido, são grandes produtores de proteases e também lipases, produzindo odores e sabores estranhos. Devido a termorresistencia de suas enzimas, eles representam o grupo mais importante na deterioração de produtos lácteos tratados termicamente. Vários trabalhos citam a importância e frequência desses microrganismos no leite (Chopra e Mathur, 1984; Ternstron, Lindberg e Molin, 1993; Crielly, Logan e Anderton, 1994) e vários outros ressaltam o envolvimento de determinados gêneros desse grupo em surtos de toxinfecção alimentar (Langeveld et al, 1996; Larsen e Jorgensen, 1997).

Nesse trabalho, as espécies identificadas com mais frequência foram *Bacillus licheniformis* e *B. coagulans*, tanto no leite cru, quanto no aquecido. Os estudos de Crielly, Logan e Anderton (1994) também citam *B. licheniformis* como o bacilo mais frequentemente encontrado nas amostras de leite cru e tratadas termicamente em laboratório.

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* representaram a maioria dos cocos Gram positivos isolados tanto no leite cru quanto no aquecido.

Esses microrganismos são considerados de grande importância em produtos lácteos, sendo reconhecidos como causadores de toxinfecções alimentares pela capacidade de produzirem enterotoxinas. Siqueira (1995) cita a presença desses microrganismos em leites e derivados mantidos sob refrigeração, principalmente quando em estado "in natura". Do mesmo modo, Cunha, Carvalho e Abreu (1996) associaram a presença de *Staphylococcus aureus* encontrada em leite cru tipo B a uma possível produção de toxinas causadoras de toxinfecção alimentar.

Os microrganismos do gênero *Micrococcus* embora tenham no leite um dos seus ambientes naturais, não se mostraram suficientemente competidores, e como todo microrganismo tipicamente láctico, requer a utilização de meios de cultura mais complexos nutricionalmente, o isolamento e identificação foram prejudicados. Segundo Varnam e Evans (1991) esses cocos são menos resistentes a tratamentos térmicos que *Staphylococcus*, mas mesmo assim também devem ser considerados como produtores de toxinas.

A presença de cocos do gênero *Enterococcus* no leite aquecido ressalta a termorresistência desses microrganismos a temperaturas mais altas. O requerimento de meios suplementados com vitaminas e peptonas é citado por Devriese e Collins (1992), assim como uma das características diferenciais mais marcantes que é a capacidade de crescimento a altas temperaturas (como 50°C, por exemplo). Frazier e Westhoff (1993) também citam a termorresistência desse gênero em relação a tratamentos térmicos como a pasteurização.

3.3.4- Aspectos gerais sobre a microbiota identificada nos leites cru e aquecido

3.3.4.1- Microrganismos isolados no leite cru

A caracterização da flora do leite cru mostrou que os principais grupos envolvidos na deterioração do leite foram os microrganismos psicrotóxicos e mesófilos cada um representando 44,7% dos isolados.

Pelos dados apresentados na tabela 3.5 pode-se notar a variedade de microrganismos isolados e destacar as bactérias do gênero *Pseudomonas*. Essas bactérias predominaram no grupo psicrotóxico (32,9%) e também apresentaram-se consideravelmente no grupo mesófilo (7,82%).

A capacidade de multiplicação à baixas temperaturas apresentada pelo gênero *Pseu* que caracteriza essas bactérias como tipicamente psicrotróficas, também foi relatada por Ternstron, Lindberg e Molin (1993); o predomínio de bactérias desse gênero em leite cru refrigerado também foi relatado pelos autores.

TABELA 3.5: Número e porcentagem de bactérias psicrotróficas, mesófilas e termófilas isoladas no leite cru.

Microrganismo	Psicrotróficos		Mesófilos		Termófilos	
	N ^o cols	%	N ^o cols	%	N ^o cols	%
<i>Pseudomonas sp</i>	59	32,9	14	7,82	0	0
<i>Flavobacterium sp</i>	0	0	4	2,2	0	0
<i>Aeromonas sp</i>	1	0,6	1	0,6	0	0
<i>Enterobacter sp</i>	4	2,2	3	1,7	0	0
<i>Pasteurella sp</i>	0	0	1	0,6	0	0
<i>Acinetobacter sp</i>	0	0	5	2,8	0	0
<i>Bacillus sp</i>	12	6,7	18	10,1	19	10,6
<i>Lactobacillus sp</i>	4	2,2	0	0	0	0
Bacilos não esporulados	0	0	16	8,9	0	0
<i>Staphylococcus sp</i>	0	0	17	9,5	0	0
<i>Micrococcus sp</i>	0	0	1	0,6	0	0
Total	80	44,7	80	44,7	19	10,6

Os microorganismos do gênero *Bacillus* foram encontrados praticamente na mesma proporção nos 3 grupos estudados. Esse gênero também é deteriorante do leite, causando problemas como sabor amargo, sabor de frutas e de papelão, além da produção da coagulação doce em leites processados. Os dados mostram que a presença desse gênero no grupo psicrotrófico (6,7%) reflete a capacidade de atuação à baixas temperaturas; a presença nos grupos mesófilos (10,1% e termófilos (10,6%), demonstram a capacidade desses microorganismos em sobreviverem à altas temperaturas devido a produção de esporos. Chopra e Mathur (1984), em estudos realizados com leite cru e pasteurizado, demonstram a ampla faixa de temperatura abrangida, na qual esses microorganismos são capazes de crescer e produzir seus esporos.

Os bacilos Gram positivos não formadores de esporos foram encontrados somente no grupo mesófilo, demonstrando a capacidade desses microorganismos se desenvolverem à temperatura ambiente. Silva (1991) encontrou variações nas contagens de mesófilos relacionadas com as estações do ano, sendo que esses bacilos não esporulados foram encontrados em

quantidades insignificantes nos períodos de inverno e verão, demonstrando a instabilidade térmica apresentada por esses microrganismos.

3.3.4.2- Microrganismos isolados do leite aquecido

Os valores obtidos para os microrganismos caracterizados no leite aquecido estão apresentados na tabela 3.6.

TABELA.3.6: Número e porcentagem de bactérias psicrotróficas, mesófilas e termófilas isoladas no leite aquecido.

Microrganismos	Psicrotróficos		Mesófilos		Termófilos	
	N ^o cols	%	N ^o cols	%	N ^o cols	%
<i>Pseudomonas sp</i>	20	28,6	6	8,6	0	0
<i>Serratia sp</i>	0	0	3	4,3	0	0
<i>Bacillus sp</i>	0	0	14	20	19	27,1
Bacilos não esporulados	0	0	1	1,4	0	0
<i>Staphylococcus sp</i>	0	0	3	4,3	0	0
<i>Enterococcus sp</i>	0	0	4	5,7	0	0
Total (70)	20	28,6	31	44,3	19	27,1

De acordo com os dados obtidos, as bactérias do gênero *Pseudomonas* continuaram sendo os microrganismos mais frequentemente isolados (28,6%), demonstrando que elas foram capazes de sobreviver ao tratamento térmico empregado. Essa termorresistencia é explicada por Schroder e Bland (1984). Segundo os autores, as bactérias Gram negativas do gênero *Pseudomonas* podem sobreviver a tratamentos térmicos quando presentes em quantidades próximas a 10^6 ufc/ml, e além disso a nata formada durante o aquecimento térmico pode exercer um efeito protetor sobre esse grupo de microrganismo. De acordo com os dados apresentados na figura 3.3, com relação aos microrganismos psicrotróficos cabe salientar que somente no 13^o e 15^o dia de estocagem foi conseguido isolar e recuperar colônias no leite aquecido, podendo considerar esse tempo como suficiente para que nas células microbianas ocorresse reparo dos danos causados pelo aquecimento, permitindo assim a multiplicação dessas bactérias sob refrigeração.

Os microrganismos do gênero *Bacillus* foram encontrados no leite aquecido entre os grupos mesófilos e termófilos. A termofilia e resistência térmica desse gênero pode ser percebida pelos dados apresentados, visto que todos os isolados do grupo termófilo apresentaram-se como bacilos esporulados. Martin (1981) demonstrou que o emprego de altas temperaturas ativa a capacidade desses microrganismos em produzirem esporos. Em seus estudos, aquecendo o leite à 100^o C por 30 minutos, o autor cita que ainda encontrou 20% de sobreviventes e caracterizou-os como sendo do gênero *Bacillus*, todos produtores de esporos.

3.4 CONCLUSÃO

O estudo da flora do leite mostrou que as bactérias Gram negativas predominaram no leite cru e tiveram uma porcentagem bem expressiva na deterioração do leite aquecido, sendo que nesse leite aquecido o predomínio maior foi de bacilos Gram positivos esporulados.

Entre as bactérias Gram negativas, o destaque é dado para as bactérias do gênero *Pseudomonas*, com as espécies *Ps. fluorescens* predominando no leite cru e *Ps. putida* no leite aquecido.

Os grupos psicrótróficos, mesófilos e termófilos mostraram, através da identificação de seus isolados, a variedade de microrganismos que podem contaminar o leite.

A presença de microrganismos termófilos do gênero *Bacillus* no leite aquecido confirmou a resistência térmica desses microrganismos à tratamentos térmicos.

A refrigeração do leite cru durante a estocagem e transporte retarda a deterioração do leite, porém não o previne contra o crescimento de bactérias psicrótróficas que são capazes de multiplicar e produzir enzimas que rapidamente alteram o produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHOPRA, A.K.; MATHUR, D.K. Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.57, n.2, p.263-271, Feb. 1984.
- COGHILL, D.; JUFFS, H. S. Incidence of psychrotrophic sporeforming in pasteurized milk and cream products and effect of temperature on their growth. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.34, n.12, p. 150-153, Dec. 1979.
- CRIELLY, E. M.; LOGAN, N. A.; ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.77, n.3, p.256-263, Mar. 1994.
- CROMIE, S. J.; DOMMETT, T. W.; SCHMIDT, D. Changes in the microflora of milk with different pasteurization and storage conditions and packaging. **The Australia Journal of Dairy Technology**, Highett, v.44, n.11, p.74-77, Nov. 1989.
- CUNHA, L. T.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Determinação das condições físico-químicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15, Poços de Caldas, 1996. **Resumos...Lavras: UFLA, 1996. Cap.2, p.73.**
- DEVRIESE, L. A.; COLLINS, M. D. The genus *Enterococcus*. In: KLOSS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. **The prokariotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p.1465-1481.
- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acríbia, 1993. 681p.
- GARCIA-ARMESTO, M. R.; PRIETO, M.; ALONSO, C.; GARCIA LOPES, M. L.; GARCIA FERNANDES, M. C.; OTERO, A. Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes'milk. **Journal of Dairy Research**, London, v.60, n.3, p.371-383, Mar. 1993.-

- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 787p.
- JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza: Acribia. 1994. 804p.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. 964p.
- KWAN, K. K.; SKURA, J. Identification of proteolytic pseudomonads isolated from raw milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.68, n.8, p.1902-1909, Aug. 1985.
- LANGEVELD, L. P. M.; VAN SPRONSEN, W. A.; VAN BERESTEIJN, E. C. H.; NOTERMANS, S. H. W. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.7, p.723-726, July. 1996.
- LARSEN, H. D.; JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, Elsevier, v.34, n.2, p.179-186, Feb. 1997.
- MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2.ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1980. 527p.
- MARTIN, J. H. Symposium: Heat resistant microorganisms in dairy food system. Heat resistant mesophilic microorganisms. **Journal Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.1, p.149-156, Jan. 1981.
- MARTIN, L. R. **Isolamento e identificação por taxonomia numérica da microbiota láctica do leite cru**. Piracicaba: ESALQ, 1993. 244p. (Tese- Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- MIKOLAJCIK, E. M.; SIMON, N. T. Heat resistant psychrotrophic bacteria in raw milk in their growth at 7 degree. **Journal of Food Protection**, Ames, v.41, n.2, p.93-95, Feb. 1978.
- MUIR, D. D.; PHILLIPS, J. D.; DALGLUSH, D. G. The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Wageningen, v. 32, n.1, p.19-23, Jan. 1979.

- PHILLIPS, J. D.; GRIFFITHS, M. W. Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. in pasteurized dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.61, n.4, p.275-285, Apr. 1986.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual - bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112p.
- ROBINSON, R. K. **Microbiologia de la leche**. Espanha: Acríbia, 1987, v.1. 230p.
- SCHRODER, M. J. A.; BLAND, M. A. Effect of pasteurization temperature on the keeping quality of whole milk. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.51, n.4, p.569-578, Apr. 1984.
- SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite**. Viçosa: UFV, 1991. 104p. (Tese- Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1995. 159p.
- SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. 1599p.
- STEVENSON, R. G.; WISDOM, G. B.; BOWE, M. T.; McCONAGHY, D. A. Growth characteristics of post-pasteurization contaminants isolated from pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, Grain Britain, v.63, n.4, p.585-591, Apr. 1996.
- TERNSTRON, A; LINDBERG, A.M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v.75, p.25-34, Jan. 1993.
- THIELMANN, C. **Avaliação das características da qualidade e prazo de validade de leite tipo A**. Viçosa: UFV. 1995. 126p. (Tese - Mestrado em Tecnologia de Alimentos)
- VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne pathogens an ilustred text**. London: Wolfe, 1991. 557p.