



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU MESTRADO
EM CIENCIA E TECNOLOGIA DO LEITE**

KELLY MOLIN DE ALMEIDA

**POPULAÇÃO DE *PSEUDOMONAS* SPP. E *P.*
FLUORESCENS EM LEITE CRU REFRIGERADO**

Londrina
2014

KELLY MOLIN DE ALMEIDA

**POPULAÇÃO DE *PSEUDOMONAS SPP.* E *P.*
FLUORESCENS EM LEITE CRU REFRIGERADO**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elsa Helena Walter de Santana

Londrina
2014

KELLY MOLIN DE ALMEIDA

POPULAÇÃO DE *PSEUDOMONAS* SPP. E *P. FLUORESCENS* EM LEITE CRU
REFRIGERADO

Dissertação apresentada à UNOPAR, no mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, área e concentração em Ciência e Tecnologia do Leite como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferido pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Profa. Dra. Elsa Helena Walter Santana
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Bruno Garcia Botaro
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Joice Sifuentes dos Santos
Pesquisadora Programa Nacional de Pós Graduação

Londrina, 01 de setembro de 2014.

*À minha família, meu pai, minha mãe e
afilhada, que sempre me deram apoio nos
momentos bons e ruins. Em especial a
minha mãe Vera, que um dia sonhou em me
ver Mestre e me ajudou a percorrer cada
etapa deste caminho, sempre ao meu lado,
com muito amor e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Elsa Helena Walter de Santana por ter me orientado com paciência, dedicação e entusiasmo. Obrigada por toda ajuda e carinho.

À CONFEPAR pela disponibilidade e colaboração na coleta das amostras, em especial ao funcionário Silas, pela ajuda e amizade.

Ao colaborador Dr. Bruno Botaro, que nos acompanhou com paciência e grande incentivo desde o início.

À colaboradora Dra. Joice Sifuentes dos Santos pela importante participação em nosso trabalho.

A todos os professores do programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite.

Aos alunos de iniciação científica Samera Rafaela Bruzaroski, Daniel Zanol e Marcela de Mello, da UNOPAR, pela colaboração durante o experimento.

Ao ex-técnico e à técnica do laboratório de pesquisa do leite, Jorge de Moraes Donato e Geicy Colognese, e à técnica do laboratório de genética Flávia Kawahigashi, pelo grande auxílio dentro do laboratório.

Aos amigos Josiane, Rafael, Luciana e Geisa, pelos momentos de estudo, de alegrias e amizade. Aos amigos Fernando Cesar e Bia Ribeiro, pela amizade, paciência e colaboração tão importantes em todos os momentos.

À minha mãe Vera, meu pai Laércio e minha afilhada Sarah, pelo incentivo e carinho. À minha amiga “Taninha” que mesmo longe sempre esteve ao meu lado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

ALMEIDA, Kelly Molin de. População de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado. 2014. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

RESUMO

A conservação do leite pelo frio e o transporte a granel favorecem a multiplicação de micro-organismos psicotróficos produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes. O gênero *Pseudomonas* spp, e a espécie *P. fluorescens* são relatados como os psicotróficos de maior frequência e importância em leite refrigerado. Este trabalho objetivou verificar e quantificar (UFC/ml) a população psicotrófica, com Ágar Padrão para Contagem (21°C/25 h); de *Pseudomonas* spp., com Ágar base para pseudomonas com suplemento CFC (30°C/48 h); *P. fluorescens*, com sementeira em Pseudomonas Cetrimide Agar com 10% de glicerol (21°C/48 h) e Aeróbios Mesófilos com Petrifilm™ AC (37°C/48 h). Foram coletadas amostras de leite refrigerado após 48 h de refrigeração de cinco produtores e do caminhão tanque (leite de conjunto- LC), desses mesmos produtores, ao chegar na indústria beneficiadora (junho/2013 a fevereiro/2014), totalizando 10 coletas. Análises físico químicas de rotina foram realizadas, sendo que somente a acidez e densidade relativa do leite dos produtores atenderam aos parâmetros de qualidade. No LC apenas o teor de proteína não atingiu o mínimo, apresentou AM > 10⁵ UFC/mL e 20% (< 10⁶ UFC/mL) de psicotróficos em relação aos AM. No LC a população de *Pseudomonas* spp. em relação a psicotróficos foi de 17,93% e *P. fluoresecens* representou 3,42% das pseudomonas. A contagem de AM do leite dos produtores variou de 3,45 x 10⁵ a 3,68 x 10⁶ UFC/mL, de psicotróficos entre 4,05 x 10⁵ e 3,13 x 10⁷ UFC/mL, de *Pseudomonas* spp. entre 2,31 x 10⁵ a 1,78 x 10⁶ UFC/mL e de *P. fluorescens* de 6,20 x 10² a 8,42 x 10⁴ UFC/mL. Não foi observada diferença estatística (p >0,05) para as populações estudadas entre a contagem média dos produtores e o LC. Neste estudo, o transporte não influenciou no aumento da contagem dos micro-organismos pesquisados e o gênero *Pseudomonas* spp, bem como a espécie *P. fluorescens* não predominaram no leite cru refrigerado.

Palavras-chave: Psicotrófico. Qualidade. Legislação. Microbiota.

ALMEIDA, Kelly Molin de. *Pseudomonas* spp and *P. fluorescens* population in refrigerated raw milk. 2014. 49 f. Dissertation (Master's Degree in Science and Technology of Milk) – Research Center for Agricultural Sciences, University of Northern Paraná, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Conserving milk in the cold and bulk transport help multiply psychrotrophic microorganisms which produce heat resistant proteolytic and lipolytic enzymes. The genus *Pseudomonas* spp and the species *P. fluorescens* are considered as the most common and important psychrotrophic in refrigerated milk. This work aimed at verifying and quantifying (CFU/ml) the population psychrotrophic with Plate Count Agar (21°C/25 h); *Pseudomonas* ssp. with Agar Base with CFC (30°C/48 h) supplement; *P. fluorescens* with seeding onto *Pseudomonas* Cetrimide Agar with 10% glycerol (21°C/48 h) and mesophilic aerobes with Petrifilm™ AC (37°C/48 h). Refrigerated milk samples were collected after 48 h of refrigeration, from five producers and from a bulk tank (mixed milk – MM) from the same producers as it reached the industry (June, 2013 to February, 2014), with total of 10 collections. Routine physical and chemical analyses were performed, with only the relative density and acidity of the milk from these producers that met the quality standards. In the MM, only the protein levels have not reached the minimum, with MA > 10⁵ CFU/mL and 20% (< 10⁶ CFU/mL) of psychrotrophic compared to MA. Also in the MM, the population of *Pseudomonas* spp. in relation to psychrotrophic was 17.93% and 3.42% of *P. fluorescens* were among the pseudomonas. The MA count of the milk from these producers ranged from 3.45 x 10⁵ to 3.68 x 10⁶ CFU/mL, psychrotrophic was between 4.05 x 10⁵ and 3.13 x 10⁷ CFU/mL, *Pseudomonas* spp. ranged from 2.31 x 10⁵ to 1.78 x 10⁶ CFU/mL and *P. fluorescens* from 6.20 x 10² to 8.42 x 10⁴ CFU/mL. There was no statistical difference (p > 0.05) in the populations studied between the average count of producers and the MM. In this study, the transport has not influenced the count growth of the microorganisms searched and the genus *Pseudomonas* spp, as well as the species *P. fluorescens* have not been predominant in the refrigerated raw milk.

Keywords: Psychrotrophic. Quality. Legislation. Microbiota.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características de produção e principais práticas de ordenha aplicadas por cinco produtores (A, B, C, D e E) da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.....36
- Tabela 2** - Parâmetros físico-químicos (Média \pm Desvio Padrão) de amostras de leite cru refrigerado coletadas de tanques de expansão individuais de cinco produtores (A, B, C D e E) e do caminhão-tanque na plataforma de uma indústria beneficiadora da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.....38
- Tabela 3** - Contagem bacteriana média (UFC/mL) de amostras de leite cru refrigerado provenientes de tanques de expansão individuais de cinco produtores (A, B, C D e E) e do caminhão-tanque de uma indústria beneficiadora da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.39
- Tabela 4** - Relação entre micro-organismos no leite cru refrigerado coletado dos tanques de expansão de cinco produtores (A, B, C, D e E) e do caminhão-tanque de uma indústria beneficiadora da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.....41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	GERAL.....	12
2.2	ESPECÍFICO	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	13
3.2	MICROBIOTA PSICOTRÓFICA EM LEITE CRU REFRIGERADO	15
3.3	<i>PSEUDOMONAS SPP.</i>	18
3.4	<i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>	20
3.5	ENZIMAS PSICOTRÓFICAS.....	21
	APÊNDICE.....	31
	APÊNDICE A – Artigo	32
	CONCLUSÃO	45
	ANEXO	46
	ANEXO A – Questionário para coleta de dados.....	47

1 INTRODUÇÃO

O resfriamento do leite nas propriedades e a granelização foram medidas estabelecidas a partir de 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002). Além de estabelecer novos parâmetros para a obtenção do leite, definiu, entre outros, os parâmetros de Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT), com objetivo de melhorar sua qualidade (NERO et al., 2005). Essa foi substituída pela Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011), que reduziu esses parâmetros e instituiu nova classificação ao leite.

Apesar dos benefícios alcançados pelas legislações e pelo resfriamento do leite cru, sua estocagem por períodos maiores que 48 horas traz problemas para a qualidade, principalmente de derivados, pois aumenta a população de micro-organismos psicotróficos, que causam sua deterioração (SANTOS et al., 2009).

Os psicotróficos encontrados no leite são, em sua maioria, Gram-negativos, provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (SANTANA et al., 2001; FAGUNDES et al., 2006; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011), e apresentam aumento na população quando o leite é obtido em más condições higiênicas (GUERREIRO et al., 2005; VIDAL-MARTINS et al., 2005; VALLIN et al., 2009; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011).

Espécies do gênero *Pseudomonas* spp. representam a microbiota psicotrófica deterioradora mais frequente do leite refrigerado (SILVA, 2005), sendo a espécie *Pseudomonas fluorescens* a mais relatada (GARG, 1990; SHAH, 1994; SILVA, 2005; ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

Apesar de os psicotróficos serem facilmente destruídos na pasteurização, suas enzimas proteolíticas e lipolíticas são termorresistentes e podem promover alterações físico-químicas e sensoriais do leite e derivados (STADHOUDERS, 1975; WASHAM; OLSON; VEDAMUTHU, 1977; COUSIN, 1982; APHA, 1992; DOMMETT, 1992; BRAMLEY; MCKINNON, 1990; MUIR, 1996; ANDRADE; AJAO; ZOTTOLA, 1998).

A literatura tem relatado a ausência do gênero *Pseudomonas* spp. em leite refrigerado, com destaque a espécie *P. fluorescens*, como o melhor indicador de

qualidade e da aplicação correta de boas práticas de ordenha, bem como ausência de possíveis alterações nos produtos processados (GARG, 1990; SHAH, 1994; SILVA, 2005; ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

Com as mudanças ocorridas nas práticas de obtenção do leite e nos parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação ao longo dos anos, entendeu-se importante verificar se o gênero *Pseudomonas* spp. bem como *P. fluorescens* se mantém como micro-organismos mais frequentes em leite cru refrigerado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O trabalho tem por objetivo verificar o impacto da refrigeração e das mudanças propostas pela legislação brasileira vigente (Instrução Normativa 62) sobre a população de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado.

2.2 ESPECÍFICO

Enumerar os micro-organismos *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado em tanques de expansão (propriedades) e em caminhões-tanque na indústria beneficiadora.

Pretende-se verificar se há diferença na população de *Pseudomonas* spp. no leite refrigerado na propriedade e naquele que chega ao beneficiamento, já na indústria processadora.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

O leite produzido no Brasil apresenta, de maneira geral, baixa qualidade, contendo altas contagens bacterianas e de células somáticas, consequência de condições de higiene e sanitização inadequadas praticadas em propriedade e indústrias (NERO et al., 2005; MELO et al., 2010; MARTINS et al., 2008; LANGONI et al., 2011).

A qualidade microbiológica do leite é consequência de sua obtenção higiênica, bem como demonstra a sanidade do rebanho. O leite de baixa qualidade reflete significativamente na sua composição, podendo reduzir sua vida de prateleira e causar problemas à saúde dos consumidores, como diarreia e vômito (FAGUNDES, 2006; MATSUBARA et al., 2011).

Para a melhoria da qualidade, foi regulamentada a refrigeração do leite nas propriedades, além do transporte a granel em caminhões isotérmicos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2002, através da Instrução Normativa nº 51 (IN 51) (BRASIL, 2002).

A IN 51 entrou em vigor no ano de 2005, trazendo mudanças no perfil produtivo da cadeia do leite, além de avanços em termos de qualidade com a regulamentação dos parâmetros de contagem de mesófilos e contagem de células somáticas. Esta Instrução Normativa foi substituída pela Instrução Normativa nº 62 (IN 62) de 2011, que alterou esses parâmetros e simplificou a classificação do leite, abolindo os leites “tipo B” e “tipo C” (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

Devido às diferentes características produtivas no país, os parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado ainda estão em processo de mudança, com prazo para estabelecimento definitivo no ano de 2015 para todas as regiões do país (BRASIL, 2011).

De acordo com as legislações IN 51 e IN 62 do MAPA, a temperatura para tanque de refrigeração por expansão direta deve ser igual ou inferior a 4º C, e em tanques de refrigeração por imersão, a temperatura deve ser igual ou inferior a 7º C. Essa temperatura deve ser atingida no tempo máximo de três horas após o término da ordenha. Para a conservação do leite no tanque comunitário ou na propriedade

rural, a temperatura deve ser de 7° C. Quando o leite é recebido no estabelecimento beneficiador, essa temperatura pode ser igual ou inferior a 10° C, sendo o tempo máximo de 48 horas desde a ordenha até a chegada do leite cru na indústria (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

Diante das condições de armazenamento, o leite cru refrigerado produzido nas regiões Sul e Sudeste podia apresentar, no máximo, 600.000 unidades formadoras de colônias (UFC) de mesófilos mL⁻¹ e 600.000 células somáticas mL⁻¹. Esse parâmetro mudou em 01 de julho de 2014, quando passou a ser de 300.000 unidades formadoras de colônias (UFC) de mesófilos mL⁻¹ e 500.000 células somáticas mL⁻¹ (BRASIL, 2011).

O resfriamento ao qual o leite é submetido após a ordenha, quando é transportado para a indústria ou armazenado no estabelecimento beneficiador até sofrer o tratamento térmico, visa diminuir a população de micro-organismos mesófilos que se multiplicam em temperatura ambiente (30° C) e que podem causar perda da matéria-prima por acidificação, devido ao consumo da lactose e produção de ácido láctico (ARCURI et al., 2006). Por outro lado, o resfriamento favorece a multiplicação de outro grupo de micro-organismos, os psicotróficos, que têm a capacidade de se multiplicar a 7° C ou menos (APHA, 1992).

Em condições sanitárias adequadas, as bactérias psicotróficas representam menos de 10 % da microbiota total do leite cru. No manejo higiênico não satisfatório os micro-organismos psicotróficos podem ultrapassar 75 % (NIELSEN, 2002). Porém, a legislação não especifica a população máxima permitida de micro-organismos psicotróficos em leite cru refrigerado.

Diversos fatores extrínsecos, como a velocidade e a temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento do leite antes de seu processamento podem afetar a composição e qualidade final deste produto (FONSECA; SANTOS, 2000). Assim, mesmo nas temperaturas de refrigeração, pode ocorrer perda da qualidade do leite se não for realizado um controle efetivo da contaminação inicial (MARTINS et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

Algumas práticas simples podem reduzir a contaminação inicial do leite por micro-organismos mesófilos e psicotróficos, como a higienização de utensílios, do ordenhador e dos animais, descarte dos primeiros jatos, *predipping* e *posdipping*, *California Mastitis Test* (CMT) e refrigeração após a ordenha. É evidente que a adoção dessas práticas reduz as contagens bacterianas e de células somáticas

aos limites permitidos pela Instrução Normativa (NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009; MATSUBARA et al., 2011). Porém muitas vezes, as práticas de higienização não são realizadas, ou mesmo são realizadas de forma insatisfatória, ocasionando perda da qualidade do produto (BRITO et al., 2004).

Os psicotróficos presentes no leite cru são provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (SANTANA et al., 2001; FAGUNDES et al., 2006; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011). A superfície de tanques de expansão, água residual e latões, juntamente com a má higienização dos tetos e equipamentos de ordenha, são citados como importantes fontes na contaminação do leite cru (SANTANA et al., 2001). Desta forma, o uso somente da refrigeração não assegura a qualidade microbiológica do leite até chegar à indústria, sendo importante um manejo correto, utilizando-se as boas práticas de ordenha (VALLIN et al., 2009; GUERREIRO et al., 2005; SILVA et al., 2011; YAMAZI et al., 2010).

A obtenção do leite com práticas higiênicas leva a redução da contagem bacteriana inicial, porém também não é suficiente para garantir sua qualidade. A temperatura e o período de armazenamento são determinantes, especialmente em relação aos micro-organismos psicotróficos, com aumento das contagens sob refrigeração ao longo do tempo (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009; SANTOS et al., 2009).

Em temperatura de 10° C a contagem desses micro-organismos foi maior que 10⁶ UFC/mL no terceiro dia de estocagem, sendo que a 4° C essa contagem foi atingida apenas no sexto dia de armazenamento (FONSECA et al., 2006). Dessa forma, a temperatura e o tempo de armazenamento influenciam diretamente na qualidade do leite e em sua vida de prateleira, conforme a contaminação inicial do leite (FAGUNDES et al., 2006; SANTANA et al., 2001).

3.2 MICROBIOTA PSICOTRÓFICA EM LEITE CRU REFRIGERADO

O termo psicotrófico foi definido pela American Public Health Association (APHA), em 1992, como micro-organismos que têm a capacidade de se multiplicar a 7° C ou menos, sem considerar sua temperatura ótima de crescimento. Alguns psicotróficos se multiplicam em temperaturas abaixo de 0°C e outros, em temperaturas próximas a 37° C.

Segundo Bramley e Mckinnon (1990) e Costa et al. (2002), os micro-organismos psicotróficos são capazes de produzir maiores quantidades de substâncias lipolíticas e proteolíticas. A produção enzimática de proteases, lipases e fosfolipases está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do micro-organismo, disponibilidade de oxigênio e composição do meio, sendo sua atividade dependente de temperatura, pH e concentração do substrato (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983).

A temperatura e o tempo de armazenamento do leite cru estão intimamente ligados com a população final de psicotróficos. Quando armazenado a 2° C, não há crescimento significativo dessas bactérias, apresentando maior população apenas entre 5 e 14 dias de armazenamento. Já em temperatura de 4° C e 7° C, o crescimento populacional é significativo desde o dia da ordenha até o dia 14 de armazenamento (KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007).

Silva et al. (2010) avaliaram a concentração de *Pseudomonas* spp. do leite cru da Associação de Produtores da região de Umuarama e a influência do armazenamento sob refrigeração inadequada na população dessas bactérias. Demonstraram que, além da qualidade microbiológica inadequada do leite, a temperatura de 7° C por 48 h de armazenamento também contribui para o aumento da população desses psicotróficos.

O armazenamento do leite por períodos acima de 48 h pode comprometer de forma importante a produção de derivados e o rendimento final do leite. Isso é agravado pela temperatura encontrada nos tanques de armazenamento nas propriedades, que chega a ser de 9° C (SANTOS et al., 2009). Dependendo do tempo de armazenamento, a temperatura de 4° C para tanques individuais e 7° C para tanques comunitários, permitida pela legislação (BRASIL, 2002), não seria suficiente para conter o alto desenvolvimento das bactérias psicotróficas no leite cru refrigerado (NORNBERG, TONDO; BRANDELLI, 2009).

Os micro-organismos psicotróficos encontrados no leite são em sua maioria, provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (BRAMLEY; MCKINNON, 1990; APHA, 1992; MUIR, 1996; ANDRADE; AJAO; ZOTTOLA, 1998; SANTANA et al., 2001; FAGUNDES et al., 2006; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011). Altas contagens desses micro-organismos demonstram que houve problemas de higienização durante a obtenção do leite, o que pode levar a redução da qualidade

e, conseqüentemente, da vida útil da matéria prima (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

Propriedades rurais com manejo higiênico inadequado na ordenha possuem maiores contagens de psicotróficos (*Pseudomonas* spp.) nos tetos dos animais e na água do uso, que sendo contaminada por essas bactérias, leva contaminação a todos os utensílios e equipamentos. Tanto o leite recém-ordenhado como o leite armazenado apresentam maiores contagens de psicotróficos do que o leite obtido com procedimentos higiênicos de ordenha (FAGUNDES et al., 2006).

A água residual presente em latões e tanques de expansão é uma das principais fontes de micro-organismos mesófilos e psicotróficos. Além disso, tetos maus higienizados e o uso apenas de água na higienização de teteiras levam a maiores contagens desses micro-organismos. O uso de solução clorada reduziu em 50 % a contagem de psicotróficos e em 14 % a de aeróbios mesófilos nas teteiras. Já a prática de *predipping* reduziu em 99,52 % a contagem de aeróbios mesófilos e em 99,03 % a de psicotróficos (SANTANA et al., 2001). Isso demonstra que o uso de práticas simples de higiene na ordenha pode colaborar para uma melhor qualidade microbiológica do leite (NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

Os psicotróficos isolados do leite e produtos derivados são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos, aeróbios e anaeróbios. Entre os Gram-negativos, o gênero *Pseudomonas* spp. é o mais frequentemente isolado em leite cru refrigerado, uma vez que apresenta melhor capacidade de multiplicação em ambiente refrigerado do que outras bactérias Gram-negativas (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; WIEDMANN et al., 2000; SILVA, 2005; ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

Santana et al. (2001) demonstraram que o leite das propriedades pesquisadas tiveram um aumento na contagem de psicotróficos que variou de 39 a 505 vezes em leite refrigerado por 12 h. A composição da microbiota presente no leite cru estudado pode ser a causa dessa variação na contagem. No mesmo estudo, todas as propriedades tiveram uma frequência de psicotróficos maior que 100% em relação aos aeróbios mesófilos, demonstrando a alta capacidade de multiplicação desses micro-organismos em temperatura de refrigeração. Isso mostra que os psicotróficos são os micro-organismos indicadores para avaliação da qualidade microbiológica em leite refrigerado.

Entre as espécies do gênero *Pseudomonas* spp. a *P. fluorescens* tem sido relatada como a mais frequente em leite refrigerado (GARG, 1990; SHAH, 1994; SILVA, 2005; ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009). Longos períodos de refrigeração do leite favorecem a multiplicação dos micro-organismos psicrotóxicos, e conseqüentemente, a produção de enzimas termo resistentes é aumentada, especialmente lipases e proteases (DATTA; DEETH, 2001).

Os psicrotóxicos, em sua maioria, não representam um grave problema para o leite e seus derivados, já que são destruídos na pasteurização (GIGANTE, 2004). A ação deterioradora das bactérias psicrotóxicas deve-se principalmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases termorresistentes (ARCURI et al., 2008). Um número mínimo de micro-organismos psicrotóxicos é necessário para que a ação das enzimas extracelulares (proteases e lipases) produzidas por estas bactérias possam promover alterações no leite e seus derivados, valores estes que variam entre 10^6 UFC/mL e 10^7 UFC/mL (MAHIEU, 1991; MUIR, 1996; FURTADO, 1999).

3.3 PSEUDOMONAS SPP.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são consideradas predominantes dentre as bactérias psicrotóxicas deteriorantes do leite cru refrigerado, devido ao curto tempo de geração em temperatura de refrigeração (SANTOS et al., 2010; STULOVA et al., 2010).

Possuem temperatura ótima de crescimento de 25° C a 30° C, e são encontradas principalmente em solo e água. Contaminam o leite cru principalmente pelo contato com a superfície dos utensílios de ordenha contaminados. São destruídas na pasteurização, porém sua ação na deterioração de alimentos está associada à produção de enzimas hidrolíticas termoestáveis, especialmente as proteases e lipases (BRAMLEY; McKINNON, 1990).

No leite recém-ordenhado, *Pseudomonas* spp. representa em torno de 10% da microbiota total. Porém, em leite refrigerado elas predominam, tanto no leite *in natura*, quanto no leite beneficiado (MUIR, 1996). A alta contagem dessas bactérias no leite cru refrigerado está associada à contagem inicial, intimamente relacionada com as práticas de higiene na ordenha, qualidade da água utilizada e

higiene do animal, especialmente superfície de tetos (FAGUNDES et al., 2006).

A contagem total de *Pseudomonas* spp. no leite está relacionada com a temperatura e o tempo de armazenamento (NIELSEN, 2002; JONGHE et al., 2011). O tempo de armazenamento nos tanques de expansão a 4° C, aliado ao tempo de armazenamento nos silos industriais, levam ao aumento da contagem no leite presente nas indústrias. A contaminação inicial advém do manejo nas propriedades e do transporte do leite (KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; STULOVA et al., 2010).

O gênero *Pseudomonas* spp. foi encontrado em 72 a 77 % das amostras de leite cru, de leite pasteurizado e em amostras ambientais de indústrias e laticínios. Dentre 66 amostras estudadas, 58% possuíam atividade proteolítica e 58 % atividade lipolítica, sendo o fator preocupante no seu controle populacional (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000). Arcuri et al. (2008) demonstraram em seu trabalho que, do total de 108 colônias de *Pseudomonas* spp. estudadas, 60,57 % apresentaram tanto atividade lipolítica quanto proteolítica.

Quantidades significantes de enzimas estão presentes e conseqüentemente surgem problemas de qualidade do leite e dos derivados, quando as contagens dessas bactérias ultrapassam 10⁶ UFC/mL (MAHIEU, 1991; MUIR, 1996; FURTADO, 1999; KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007). Em seu trabalho, Stulova et al. (2010) encontraram *Pseudomonas* spp. como a microbiota predominante nos tanques de refrigeração de leite cru, sendo *P. fluorescens* a espécie predominante.

Quanto maior a contagem de micro-organismos psicrotóxicos na matéria prima, maior é o índice proteolítico encontrado no leite beneficiado. A ação das enzimas aumenta no decorrer do tempo de armazenamento (VIDAL-MARTINS et al., 2005). A ação de lipases e proteases bacterianas é influenciada pela temperatura e tempo de armazenamento do leite. Em temperatura de 2° C, não houve diferença significativa ($p < 0,01$) na ação lipolítica e proteolítica entre os dias 0 e 3, porém houve diferença entre os dias 5, 7 e 14. Já em temperatura de 4° C e 7° C, houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os dias 0, 3, 5, 7 e 14 de armazenamento (KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007).

A população de *Pseudomonas* spp. se desenvolve em condições subótimas de refrigeração, nos caminhões durante o transporte, e continua a se desenvolver em condições ótimas de refrigeração nos silos das indústrias (JONGHE

et al., 2011). Pinto, Martins e Vanetti (2006), demonstraram que a contagem desses micro-organismos foi sempre maior ($p > 0,05$) nos silos industriais do que nos tanques individuais e coletivos das propriedades, incluindo aumento nas atividades lipolítica e proteolítica no leite.

3.4 *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

No leite cru refrigerado, a espécie *P. fluorescens* é apontada como a predominante, sendo a que possui o crescimento mais rápido no leite e a principal produtora de enzimas, especialmente lipases (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; COSTA et al., 2002; NORBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009; LEDENBACH; MARSHALL, 2010; STULOVA et al. 2010).

Essa espécie pode aumentar a insolubilidade, o volume de espuma e a dispersibilidade média de leite liofilizado quando sua contagem excede 10^6 UFC/mL no leite cru (BRAMLEY; McKINNON, 1990). Em meio de cultura apropriado, *P. fluorescens* produz um pigmento fluorescente difusível durante seu crescimento (MUIR, 1996). Pinto, Martins e Vanetti (2006), encontraram o pigmento fluorescente em 77,4 % dos isolados não fermentadores de glicose.

Em baixas temperaturas, o transporte ativo e a difusão de nutrientes para dentro das células bacterianas são reduzidos. Para compensar isso, há um aumento na produção de várias enzimas, incluindo as lipases (BUCKY; HAYES; ROBINSON, 1986).

Costa et al. (2001) demonstraram que *P. fluorescens* foi uma das bactérias mais frequentes encontradas no leite em região do Chile, sendo uma das maiores produtoras de proteases.

Das 161 bactérias Gram negativas encontradas por Arcuri et al. (2008) em seu estudo, 94 eram *P. fluorescens*. Todas as colônias dessa espécie foram lipolíticas a 4° C, 7° C, 10° C e 21° C e a atividade proteolítica, a essas mesmas temperaturas, foi verificada em 66 %, 74,5 %, 88,3 % e 95,75 % das colônias.

Cultivos realizados por Costa et al. (2002), com inoculação de *P. fluorescens* em leite cru refrigerado a 6° C, mostraram uma considerável produção de enzimas com elevada atividade proteolítica a partir de 72 h de incubação. Gugi et al. (1991) demonstraram que a produção de proteases por *P. fluorescens* apresentou

máxima atividade proteolítica a 17,5° C, sendo essa temperatura considerada ótima.

Em cultivos a 4° C, 6° C, 8° C e 10° C, as enzimas começaram a ser produzidas por *P. fluorescens* a partir de 60 h de cultivo, correspondendo à fase estacionária do crescimento bacteriano, com contagem de cerca de 10⁷ UFC/mL. A 2° C, o crescimento bacteriano foi mínimo, reduzindo drasticamente a produção enzimática (COSTA et al., 2001). Em temperatura de refrigeração, *P. fluorescens* produzem quantidades relativamente altas de proteases (SANTOS et al., 2010).

Santos et al. (2009) encontraram que 20,58 % das amostras eram positivas para *P. fluorescens*, não sendo positivas para CMP (caseinomacropéptido). Santos et al. (2010) encontraram resultado parecido, demonstrando que *P. fluorescens* talvez não seja a principal espécie responsável pela proteólise em leite com contagens de 10⁶ UFC/mL ou menos.

3.5 ENZIMAS PSICOTRÓFICAS

A produção enzimática de proteases, lipases e fosfolipases está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do micro-organismo, disponibilidade de oxigênio e composição do meio, sendo sua atividade dependente de temperatura, pH e concentração do substrato (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983).

Segundo Mahieu (1991), a síntese destas proteases têm pH ótimo de 7,8, ocorrendo a atividade máxima entre 40° C e 45° C, mantendo-se ativas mesmo em temperatura e pH inferiores. As lipases são produzidas em maior quantidade em temperatura entre 20° C e 21° C, podendo manter sua atividade em 50 % a 0° C.

As proteases produzidas por psicotróficos são capazes de degradar kapa (κ), alfa s-1 (α s-1) e beta (β) caseínas, ligadas a geleificação do leite Ultra Alta Temperatura (UAT) (COUSIN, 1982), sendo a κ -caseína a mais suscetível, levando a desestabilização das micelas e coagulação. As proteínas do soro são mais resistentes ao ataque das proteases (COSTA et al., 2002).

As proteases podem aumentar o tempo de coagulação do leite em cerca de 20 % e 27 %, se o produto for mantido a 3° C por 24 e 48 h, respectivamente (FURTADO, 1999). Como efeito da ação destas enzimas, observa-se no leite alterações na coagulação e sabor amargo, e nos queijos, alterações nos processos de fermentação, coagulação e maturação (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983). Na maturação,

principalmente de queijos macios e semiduros, o gosto amargo é associado à liberação de peptídeos de baixo peso molecular pela ação das proteases (FURTADO, 1999).

A produção destas enzimas por cepas de *Pseudomonas* spp. ocorre em temperatura de refrigeração, principalmente no final da fase log de crescimento celular. Mahieu (1991) observou que a produção de proteases foi mais significativa em temperaturas baixas do que em temperaturas mais elevadas. *Pseudomonas fluorescens* sintetiza seis vezes mais proteases a 3° C que a 29° C. Em baixas temperaturas, *Pseudomonas* spp. possuem uma fase lag curta e uma fase estacionária longa, podendo sobreviver por longos períodos em resíduos de leite (SORHAUNG; STEPANIAK, 1997).

A atividade dessas enzimas difere, além da temperatura, também em relação ao tempo de resfriamento do leite cru. Em temperatura de 2° C, a ação das proteases e lipases não diferiu entre os dias 0 e 3, porém houve diferença entre os dias 5, 7 e 14 de armazenamento. Já em temperatura de 4° C e 7° C, a ação das enzimas diferiu entre os dias 0, 3, 5, 7 e 14 de armazenamento. Houve grande redução no crescimento e nas atividades lipolítica e proteolítica dos psicotróficos quando se reduziu a temperatura de 7° C para 2° C (KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007).

A temperatura ótima para os micro-organismos psicotróficos produzirem enzimas é menor que a temperatura ótima para o crescimento celular. Desta forma, é possível encontrar em leite refrigerado alterações sensoriais mesmo com a presença de um número de micro-organismos menor que o necessário para promover estas alterações em temperaturas mais elevadas (TINUOYE; HARMON, 1975).

Em cultivos realizados com leite cru a 6° C com *P. fluorescens*, houve uma grande produção enzimática e alta atividade de proteases bacterianas a partir de 72 h de incubação, quando a contagem bacteriana atingiu 10⁷ UFC/ mL (COSTA et al., 2002).

A proteólise que ocorre no leite é benéfica e essencial para o desenvolvimento das características de alguns produtos lácteos, como sabor e textura durante a coagulação de queijos. Porém, quando a proteólise é descontrolada ou indesejada, pode trazer efeitos ruins a esses produtos (NIELSEN, 2002).

Apesar de se conhecer a ação degradante das proteases de bactérias psicotróficas do leite, sua ação proteolítica não é correlacionada somente com a alta

contagem de bactérias, mas também com as espécies de bactérias psicotróficas presentes, capazes de produzir mais ou menos enzimas termo resistentes, além da atividade de enzimas endógenas do leite (SANTOS et al., 2009; NORNBORG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

Santos et al. (2009), ao avaliarem o efeito do tempo e da temperatura de refrigeração na multiplicação de psicotróficos em leite, verificaram que amostras de leite cru com alta população de bactérias psicotróficas e psicotróficas proteolíticas não possuíam, necessariamente, atividade proteolítica mais elevada em comparação com amostras de contagem baixa. Neste estudo, 20,58% das amostras apresentaram-se positivas para *P. fluorescens*, não sendo positiva a presença de caseinomacropéptídeos na análise de cromatografia líquida de alta eficiência. Segundo os autores, deve-se levar em consideração o tipo de microbiota contaminante e a atividade de enzimas endógenas do leite.

A estabilidade do leite é hoje uma das principais preocupações das indústrias de leite UAT, por limitar a vida de prateleira do produto (DATTA; DEETH, 2001). Os principais problemas que ocorrem são o desenvolvimento de sabor e odor desagradável e a geleificação durante o armazenamento (GIGANTE, 2004). A geleificação é a perda de fluidez do leite com formação de gel, que pode ser causada por protease natural do leite (plasmina), quando este é cru e de boa qualidade, ou por proteases de psicotróficos, quando o leite cru é de baixa qualidade (FOX; McSWEENEY, 1998).

A refrigeração do leite faz com que ocorra a dissociação das caseínas da micela, principalmente a β -caseína. O armazenamento do leite a 4^o C faz com que até 30 % das β -caseínas estejam em fase não micelar. Dessa forma, as proteases agem mais intensamente, liberando peptídeos que causam sabor desagradável no leite pasteurizado e amargo no leite UAT. A proteólise reduz, ainda, o rendimento na produção de queijo, já que na coagulação, a fração proteica removida da micela não é incorporada ao coágulo, além de causar defeitos nesse produto (NORNBORG; TONDO; BRANDELLI, 2009; FOX; McSWEENEY, 1998).

Além de sua ação sobre as proteínas do leite, os psicotróficos também podem agir convertendo plasminogênio a plasmina, o que pode levar a uma geleificação mais rápida do leite (GIGANTE, 2004). Uma das formas mais adequadas de se controlar a geleificação seria a melhoria da qualidade microbiológica da matéria prima, bem como melhor orientação aos produtores e controle da temperatura de

armazenamento. Isso para que o leite seja resfriado rapidamente e de forma homogênea, evitando maior multiplicação de psicotróficos e geração de enzimas (VESCONSI; VELDUGA; CICHOSKI, 2012).

A presença de psicotróficos, além de causar problema pela produção de enzimas, tem causado dificuldades no controle da adição fraudulenta de soro, proveniente da fabricação de queijo, ao leite fluido. As proteases de *P. fluorescens* B52, assim como a quimosina, são capazes de hidrolisar a κ -caseína na ligação 105-106, levando a formação do caseinomacropéptido (CMP). Assim, a presença de CMP não pode ser usada como indicador desse tipo de fraude (GIGANTE, 2004).

Santos et al. (2009) encontrou resultado negativo para CMP em todas as amostras, indicando que altas contagens de bactérias psicotróficas não possuem maiores atividades proteolíticas do que amostras com baixas contagem. Deve-se levar em consideração o tipo de microbiota contaminante e a atividade das enzimas endógenas do leite.

As enzimas lipolíticas naturais do leite ou produzidas por micro-organismos causam hidrólise de lipídios, levando à liberação de ácidos graxos que resultam na rancificação do produto lácteo destinado ao consumo (MUIR, 1996) e na geleificação do leite UAT (FURTADO, 1999). As alterações, como sabor “ardido” ou saponificado nos queijos, aparecem ao longo da maturação prolongada e dependendo da produção enzimática, pode ocorrer também um comprometimento na multiplicação das culturas lácteas (FURTADO, 1999).

As degradações no leite causadas por ação das enzimas lipolíticas são menos predominantes que as causadas por enzimas proteolíticas, pois as enzimas lipolíticas têm uma menor termoestabilidade (GARG, 1990; MAHIEU, 1991; SHAH, 1994). Os tratamentos térmicos do leite como a pasteurização e UAT, determinam queda na atividade lipolítica de 75 % e 91,6 %, respectivamente. Porém, algumas lipases bacterianas resistem à esterilização a 130° C por 15 segundos (SHAH, 1994).

Pseudomonas spp. são os micro-organismos que mais se associam a alterações lipolíticas no leite, que podem ser provocadas também pelos gêneros *Aeromonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (SHAH, 1994). De acordo com Muir (1996), mais de 70 % das cepas de *P. fluorescens* possuem a capacidade de sintetizar enzimas proteolíticas e lipolíticas.

Superfícies mal higienizadas, como a de tanques de caminhões que

transportam o leite cru refrigerado, geralmente geram um ambiente propício à formação de biofilmes. Nestas superfícies, há produção de lipases, gerando perda da qualidade do leite e redução da vida útil do leite (TEH et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Milk and milk products. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association (APHA), p.837-856, 1992.
- ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 61, n. 11, p. 1454-1458, 1998.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p.440-446, 2006.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.
- BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. *Dairy Microbiology: the microbiology of milk*. 2. ed. London/New York: Elsevier, 1990. p. 163-207.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução Normativa 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução Normativa 62, de 29 de Dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Seção 1, 2011.
- BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; SOUZA, G. N.; ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. R. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2004.
- BUCK, A. R.; HAYES, P. R.; ROBINSON, D. S. Lipase production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in whole milk and skimmed milk. *Food Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 37-44, jan. 1986.
- COSTA, M.; GOMÉZ, M. F.; MOLINA, L. H.; ROMERO, A. Cinética de crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda a temperaturas de refrigeración. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 51, n. 4, p. 371-375, dec. 2001.

COSTA, L. M.; GOMÉS, M. F.; MOLINA, L. H.; ROMERO, A. Purificación y Caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la Leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 52, n. 2, p. 1-13, 2002.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 45, n. 2, p.172-207, 1982.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk – A review. *Institution of Chemical Engineers*, v. 79, n. 4, p. 197-210, dec. 2001.

DOMMETT, T. W. Spoilage of Aseptically Packaged Pasteurized Liquid Dairy Products by Thermoduric Psychrotrophic. *Food Australia*, v. 10, n. 44, p. 459-461, 1992.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of Milk with Gram-negative Spoilage Bacteria During Filling of Retail Containers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 57, n. 1, p. 99-106, jun. 2000.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do Leite e Controle de Mastite*. São Paulo: Lemos editorial, 2000.

FONSECA, C. R.; PORTO, E.; DIAS, C. T. S.; SUSIN, I. Qualidade do leite de cabra *in natura* e do produto pasteurizado armazenados por diferentes períodos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 944-949, 2006.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer Science & Business Media, 1998.

FURTADO, M. M. *Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção*. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1999.

GARG, S. K. Psychrotrophs in Milk: a review. *Indian Journal Dairy Science*, v. 43, n. 3, p. 443-440, 1990.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. O compromisso com a Qualidade do Leite. UPF, v. 1, p. 235-254, 2004.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, feb. 2005.

GÜGI, B.; ORANGE, N.; HELLIO, F.; BURINI, J. F.; GUILLOU, C.; LERICHE, F.; GUESPIN-MICHEL, J. F. Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 12, p. 3814-3820, 1991.

JONGUE, V.; COOREVITS, A.; HOORDE, K. V.; MESSENS, W.; LANDSCHOOT, A. V.; VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 3, n. 11, p. 1383-1387, 2007.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LEDENBACH, L. H.; MARSHALL, R. T. Microbiological spoilage of dairy products. In: SPERBER, W. H.; DOYLE, M. P. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. *Food Microbiology and Food Safety*, v. 12, p. 367, 2010.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche despues de su recogida. In: LUQUET, F. M. *Leche y Productos Lacteos. La leche de la Mama a la Lechería*. Zaragoza: Acribia, p. 181-226, 1991.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. L. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.

MATSUBARA, M. T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; BATTAGLINI, A. P. P.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 1, p. 277-286, 2011.

MELO, B. A.; SANTOS, T. M. C.; BARBOSA, Y. R. S.; MOURA, C. T. R.; MONTALDO, Y. C. Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro – Alagoas. *Revista Verde de Agricultura e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, v. 5, n. 5, p.1-5, 2010.

MUIR, D. D. The shelf-life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in Milk: Characteristics, Roles and Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 22, p. 6628-6624, 2002.

NORNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos. Efectos sobre la leche y los productos lácteos. *Revista Espanhola de Lecheria*, n. 130, p. 251-260, 1983.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, L. M.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, jul./set. 2006.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do Leite em Diferentes Pontos do Processo de Produção: I. Microrganismos Aeróbios Mesófilos e Psicotróficos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n.2, p. 145-154, jul./dez. 2001.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do Tempo e da Temperatura de Refrigeração no Desenvolvimento de Microrganismos em Leite Cru Refrigerado na Macrorregião de Goiânia, GO. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, out./dez. 2009.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; MOREIRA, G. N.; BARROS, J. C.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Evolução da proteólise do leite inoculado *in vitro* com *Pseudomonas fluorescens*. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 313-320, jul./dez. 2010.

SHAH, N. P. Psychrotrophic in Milk: a Review. *Milchwissenschaft*, v. 49, n. 8, p. 432-437, 1994.

SILVA, P. D. L. Avaliação, Identificação e Atividade Enzimática de Bactérias Psicotróficas presentes no Leite Refrigerado. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

SILVA, M. R.; SACANAVACCA, J.; GANDRA, T. K. V.; SEIXAS, F. A. V.; GANDRA, E. A. Avaliação higiênico-sanitária do leite produzido em Umuarama (Paraná). *B.CEPPA*, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 271-280, jul./dez. 2010.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; D'OIDIO, R. T. L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276, 2011.

SORHAUNG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophics and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 35-41, fev. 1997.

STADHOUDERS, J. Microbes in Milk and Dairy Products. An Ecological Approach. *Neth. Milk Dairy Journal*, v. 29, p. 104-126, 1975.

STULOVA, I.; ADAMBERG, S.; KRISCIUNAUTE, T.; KAMPURA, M.; BLANK, L.; LAHT, T-M. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 6 p. 683-690, dec. 2010.

TEH, K. H.; LINDSAY, D.; PALMER, J.; ANDREWES, P.; BREMER, P.; FLINT, S. Lipolysis within single culture and co-culture biofilms of dairy origin. *International Journal of Food Microbiology*, v. 163, n. 2, p. 129-135, may. 2013.

TINUOYE, O. L.; HARMON, L. G. Growth of thermoduric psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. *American Dairy Review*, v. 37, n. 9, p. 26-30, 1975.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; Silva, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas na ordenha de 19 municípios da região central do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 1, p.181-188, 2009.

VESCONSI, C. N.; VALDUGA, A. T.; CICHOSKI, A. J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. *Ciência Rural*, v. 42, n. 4, p. 703-736, 2012.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; JUNIOR, O. D. R.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 4, p.698-704, 2005.

WASHAM, C. J.; OLSON, H. C.; VEDAMUTHU, E. R. Heat-resistant Psychrotrophic Bacteria Isolated From Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection*, v. 40, n. 2, p.101-108, fev. 1977.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, K. J. Molecular and Phenotypic Characterization of Pseudomonas spp. Isolated From Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 2085-2095, 2000.

YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VOÇOSA, G. N.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 610-618, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo

ALMEIDA, Kelly Molin de. População de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado. 2014. 49 f. Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

RESUMO

Coletou-se leite cru em tanque de expansão de cinco produtores e do caminhão tanque (leite de conjunto – LC) destes mesmos produtores ao chegar na indústria beneficiadora. Análises físico químicas de rotina foram realizadas, quantificou-se a população psicotrófica, de *Pseudomonas* spp., *P. fluorescens* e de aeróbios mesófilos (AM). Somente a acidez e densidade relativa do leite dos produtores atenderam aos parâmetros de qualidade. No LC apenas o teor de proteína não atingiu o mínimo, apresentou AM $> 10^5$ UFC/mL e 20% ($< 10^6$ UFC/mL) de psicotróficos em relação aos AM. No LC a população de *Pseudomonas* spp. em relação a psicotróficos foi de 17,93% e *P. fluorescens* representou 3,42% das pseudomonas. A contagem de AM do leite dos produtores variou de $3,45 \times 10^5$ a $3,68 \times 10^6$ UFC/mL, de psicotróficos entre $4,05 \times 10^5$ e $3,13 \times 10^7$ UFC/mL, de *Pseudomonas* spp. entre $2,31 \times 10^5$ a $1,78 \times 10^6$ UFC/mL e de *P. fluorescens* de $6,20 \times 10^2$ a $8,42 \times 10^4$ UFC/mL. Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) para as populações estudadas entre a contagem média dos produtores e o LC. Assim nesta linha estudada, o gênero *Pseudomonas* spp. *P. fluorescens* não foram os psicotróficos mais frequentes.

Palavras-chave: Psicotrófico. Qualidade. Enzimas psicotróficas.

ALMEIDA, Kelly Molin de. *Pseudomonas* spp and *P. fluorescens* population in refrigerated raw milk. 2014. 49 f. Master's Degree in Science and Technology of Milk – Research Center for Agricultural Sciences, University of Northern Paraná, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Raw milk was collected from cooling tanks of five producers and from a bulk tank (mixed milk - MM) of the same producers as it reached the industry. Routine physical and chemical analyses were performed quantifying the psychrotrophic population, the *Pseudomonas* spp., the *P. fluorescens* and the mesophilic aerobes (MA). Only relative density and acidity of the milk from these producers met the quality standards. In the MM, only the protein levels have not reached the minimum, with MA $> 10^5$ CFU / mL and 20% ($< 10^6$ CFU / mL) of psychrotrophic compared to MA. Also in the MM, the population of *Pseudomonas* spp. in relation to to psychrotrophic was 17.93% and 3.42% of *P. fluorescens* were among the pseudomonas. The MA count of the milk from these producers ranged from 3.45×10^5 to 3.68×10^6 CFU / mL, psychrotrophic was between 4.05×10^5 and 3.13×10^7 CFU / mL, *Pseudomonas* spp. ranged from 2.31×10^5 to 1.78×10^6 CFU/mL and *P. fluorescens* was between 6.20×10^2 and 8.42×10^4

CFU / mL. There was no statistical difference ($p > 0.05$) in the populations studied between the average count of producers and the MM. Therefore, in this study, the genus *Pseudomonas* spp. *P. fluorescens* were not the most common psychrotrophic.

Key words: Psychrotrophic. Quality. Psychrotrophic enzymes.

INTRODUÇÃO

O resfriamento do leite nas propriedades e a granelização foram medidas estabelecidas a partir de 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002) com objetivo de melhorar a qualidade do leite e seus derivados. Para isto a Instrução Normativa (IN) 51 entrou em vigor no ano de 2002, trazendo mudanças no perfil produtivo da cadeia do leite, além de avanços em termos de qualidade com a regulamentação dos parâmetros de contagem de mesófilos e contagem de células somáticas (BRASIL, 2002). A IN 51 foi substituída pela IN 62 em 2011, determinando que o leite cru refrigerado produzido nas regiões Sul e Sudeste devesse atingir, no máximo, 600.000 unidades formadoras de colônias (UFC) de mesófilos mL^{-1} e 600.000 células somáticas (CCS) mL^{-1} . Esse parâmetro mudou em 1 de julho de 2014, quando passou para 300.000 UFC de mesófilos mL^{-1} e 500.000 CCS mL^{-1} (BRASIL, 2011).

De acordo com a IN 51 e IN 62 do MAPA, os tanques de refrigeração por expansão direta devem manter o leite em temperatura igual ou inferior a 4°C , e em tanques de refrigeração por imersão, a temperatura do leite deve ser igual ou inferior a 7°C . Essa temperatura deve ser atingida no tempo máximo de três horas após o término da ordenha. Para a conservação do leite no tanque comunitário ou na propriedade rural, a temperatura deve ser de 7°C . Quando o leite é recebido no estabelecimento beneficiador, essa temperatura pode ser igual ou inferior a 10°C , sendo o tempo máximo de 48 h desde a ordenha até a chegada do leite cru na indústria (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

No entanto, a estocagem do leite cru refrigerado por períodos superiores a 48 h e/ou com carga microbiana inicial alta é um problema para a qualidade do leite e principalmente de derivados, pois aumenta a população de microorganismos psicrotróficos, refletindo negativamente na qualidade do leite cru refrigerado (SANTOS et al., 2009). Este grupo de bactérias são, em sua maioria, Gran-

negativos, produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes (BRAMLEY; McKINNON, 1996; MUIR, 1996; ANDRADE; AJAO; ZOTTOLA, 1998), provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011), e apresentam aumento na população quando o leite é produzido em más condições higiênicas (VALLIN et al., 2009; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011).

Espécies do gênero *Pseudomonas* spp. representam a microbiota psicrotrofica deterioradora mais frequente do leite cru refrigerado sendo a espécie *Pseudomonas fluorescens* a mais relatada (ARCURI et al., 2008; FAGUNDES et al., 2006; JAYARAO; WANG, 1999; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SHAH, 1994; SANTOS et al., 2009). Devido às mudanças no panorama da cadeia produtiva do leite no Brasil, vê-se a necessidade em verificar o impacto da refrigeração e das mudanças propostas pela legislação brasileira vigente (IN 62) sobre a população de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar e quantificar a presença de micro-organismos psicrotrofos, *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado de diferentes produtores, bem como o efeito do transporte sob refrigeração nessas populações.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite foram coletadas entre os meses de junho de 2013 a fevereiro de 2014, totalizando 10 coletas de leite dos tanques de expansão de cinco produtores (A, B, C, D e E) do município de Londrina, com 48 h de refrigeração. Foram também coletadas amostras do leite de conjunto (LC) do caminhão-tanque destes mesmos produtores transportado à indústria beneficiadora. A linha de leite estudada foi de 71 Km entre os produtores e a indústria beneficiadora, considerada próxima do setor captador. No início do estudo foi aplicado um questionário tipo misto (respostas abertas e fechadas) aos produtores para obter informações sobre as boas práticas de ordenha e produção leiteira.

Foram coletados 600 ml de leite do resfriador das propriedades, após homogeneização mecânica pelo equipamento de refrigeração durante cinco minutos. Na plataforma de recepção da indústria beneficiadora, 1200 ml de leite (6 porções de 200 ml de pontos distintos) foram coletados diretamente de caminhões-tanque

provenientes somente das propriedades analisadas. A temperatura do leite indicada nos equipamentos foi registrada.

Todas as amostras foram mantidas em caixa isotérmica com gelo reciclável e levadas ao laboratório de Microbiologia do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da UNOPAR para análise imediata.

Análises físico-químicas

Foram avaliados o teor de proteínas totais (%), densidade (g/mL), teor de gordura (%), extrato seco desengordurado (ESD) (%), acidez titulável (°D) e índice crioscópico (IC) (°H) segundo AOAC (1995). As análises foram realizadas em triplicata.

Análises microbiológicas

Para determinação de aeróbios mesófilos foi utilizado Petrifilm™ AC (3M do Brasil Ltda), a 37° C / 48 h (HOUGHTBY et al., 1992). A contagem de psicotróficos foi realizada através do plaqueamento em superfície no meio de cultura Plate Count Agar –PCA (Himedia, Mumbai, Índia) a 21° C/ 25 h (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992). Para enumeração de *Pseudomonas* spp. utilizou-se a semeadura em superfície em *Pseudomonas* Ágar Base com adição de suplemento CFC (Himedia, Mumbai, Índia marca, por extenso), a 30° C/48 h (FAGUNDES et al., 2006).

Para contagem de *P. fluorescens* 2,5 ml das amostras de leite foram pré incubadas a 21° C por 18 h em 5 mL de caldo tripticaseína e soja – TSB (Himedia, Mumbai, Índia). A partir do caldo foram realizadas diluições decimais que foram plaqueadas em superfície em *Pseudomonas Cetrimide Agar* (Himedia, Mumbai, Índia) adicionado de 10% de glicerol. Após incubação a 21° C/ 48 h, foram contadas somente as colônias amarelo-esverdeadas quando observadas à luz ultravioleta (380 nm) (SANTOS et al., 2009).

Todos os resultados microbiológicos foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por mL da amostra e, com exceção da contagem de aeróbios mesófilos, todas as análises foram realizadas em duplicata.

Análise estatística

Os resultados físico-químicos e microbiológicos foram avaliados através da Análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p < 0,05$ e $p < 0,10$) usando o programa Statistica (STATSOFT, 2008). Os resultados foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão (DP), comparando o leite do tanque dos produtores e do caminhão tanque, e estes dados ao longo das dez coletas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as propriedades estudadas possuíam tanque de expansão individual, sala de ordenha coberta e com piso. A qualidade físico química e microbiológica da água era desconhecida dos entrevistados. O leite produzido pelos produtores B e C frequentemente congelava no tanque de expansão na primeira ordenha após captação pela indústria, problema este ocasionado pelo superdimensionamento do equipamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Características de produção e principais práticas de ordenha aplicadas por cinco produtores (A, B, C, D e E) da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.

Característica/Produtor	A	B	C	D	E
Produção (L/dia)	208	450	550	450	2000
Fonte de água	Mina	Mina	Poço artesiano	Poço artesiano	Mina
Água clorada	Não	Não	Não	Não	Sim
Tipo de ordenha	Mecânica SF	Mecânica em SF	Mecânica SF	Mecânica SF	Mecânica SF
Presença de água residual no tanque de expansão	Não	Sim	Sim	Não	Não
Realização do teste da caneca de fundo escuro	Não*	Sim	Não*	Sim	Sim
Realização do <i>California Mastitis Test</i>	Não*	Não	Não*	Sim	Sim
Realização do Predipping	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Secagem dos tetos com papel toalha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Realização do Posdipping	Não	Não	Não	Sim	Sim

SF= Sistema Fechado

*Realizam o teste somente quando observam algum problema.

Entre os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras dos cinco produtores ao longo das 10 coletas, somente os valores médios de acidez e densidade relativa atenderam aos parâmetros mínimos de qualidade estipulados pela IN 62, de 14 a 18 °D e 1,029 a 1,030 a 15/15° C g/mL, respectivamente (BRASIL, 2011) (Tabela 2). O produtor C apresentou os maiores problemas, onde foi constatada a adição de água, indicada pelo valor de crioscopia encontrado (-0,509 °H) e consequentemente redução do ESD (8,19 %), além de baixo teor de gordura (2,8%) (Tabela 2). A adição de água no leite altera o ponto de congelamento, fazendo com que se aproxime de 0°C (ponto de congelamento da água), devido à diluição dos componentes, especialmente lactose e cloretos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). O leite de conjunto do caminhão apresentou os parâmetros físico-químicos dentro do exigido pela legislação, exceto para o teor de proteína, que esteve abaixo do mínimo determinado (2,9%). O reduzido teor de proteína também foi observado no leite da maioria dos produtores estudados (Tabela 2) podendo ser relacionado com a baixa oferta de matéria seca na alimentação ou mesmo baixa qualidade das pastagens (MARTINS et al., 2006).

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos (Média ± Desvio Padrão) de amostras de leite cru refrigerado coletadas de tanques de expansão individuais de cinco produtores (A, B, C D e E) e do caminhão-tanque na plataforma de uma indústria beneficiadora da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.

Produtor	ESD (%)	Acidez (°D)	Índice crioscópico (°H)	Densidade 15/15 °C g/ mL	Gordura (%)	Proteína (%)
A	8,56 ^a ± 0,25	14,70 ^b ± 1,16	0,537 ^b ± 0,009	1030 ^{A,B} ± 0,82	4,09 ^a ± 0,42	2,71 ± 0,24
B	8,47 ^{a,b} ± 0,22	16,47 ^a ± 1,08	0,546 ^a ± 0,008	1030 ^{A,B} ± 0,80	3,54 ^b ± 0,27	2,84 ± 0,35
C	8,19 ^c ± 0,45	16,18 ^a ± 2,68	0,509 ^c ± 0,025	1029 ^B ± 1,96	2,83 ^c ± 0,60	2,64 ± 0,43
D	8,33 ^{b,c} ± 0,09	15,66 ^{a,b} ± 1,24	0,538 ^b ± 0,007	1029 ^{A,B} ± 0,47	3,34 ^b ± 0,21	2,79 ± 0,68
E	8,51 ^{a,b} ± 0,12	16,00 ^{a,b} ± 1,22	0,537 ^b ± 0,007	1030 ^A ± 0,51	3,53 ^b ± 0,22	2,94 ± 0,38
Caminhão tanque	8,39 ^{b,c} ± 0,24	16,30 ^a ± 0,94	0,538 ^b ± 0,007	1030 ^{A,B} ± 0,71	3,23 ^b ± 0,50	2,81 ± 0,51

* Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ** Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,10$).

Valores de normalidade (BRASIL, 2011): Extrato seco desengordurado (ESD) mínimo de 8,4%; índice crioscópico de - 0,530 a -0,550°H; densidade 15/15 °C de 1,028 a 1,034 g/ml; gordura mínimo 3%; proteína mínimo de 2,9%

Tabela 3 - Contagem bacteriana média (UFC/mL) de amostras de leite cru refrigerado provenientes de tanques de expansão individuais de cinco produtores (A, B, C D e E) e do caminhão-tanque de uma indústria beneficiadora da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.

		A	B	C	D	E	Média dos produtores	Caminhão-Tanque
Temperatura (°C)	Média	3,1	4,0	3,3	3,4	3,3	3,4	6,6
	Mínimo	2,0	3,0	2,0	3,0	3,0	2,6	5,0
	Máximo	7,0	5,4	5,2	4,7	4,0	5,3	8,9
Mesófilos (UFC/mL)	Média	1,65x10 ⁶ a,b	3,68 x10 ⁶ a	3,48 x10 ⁶ a,b	8,41 x10 ⁵ b	3,45 x10 ⁵ b	2,03 x10 ⁶ A	1,39 x10 ⁶ a,b,A
	Mínimo	3,00 x10 ⁵	5,30 x10 ⁵	6,00 x10 ⁴	6,00 x10 ⁴	1,10 x10 ⁵	4,97 x10 ⁵	4,90 x10 ⁵
	Máximo	3,19 x10 ⁶	9,80 x10 ⁶	2,07 x10 ⁷	3,07 x10 ⁶	5,70 x10 ⁵	3,68 x10 ⁶	2,60 x10 ⁶
Psicrotróficos (UFC/mL)	Média	1,58 x10 ⁶ a	9,50 x10 ⁶ a	3,13 x10 ⁷ a	1,52 x10 ⁶ a,b	4,05 x10 ⁵ b	8,89 x10 ⁶ A	2,85 x10 ⁶ a,A
	Mínimo	2,10 x10 ⁴	1,35 x10 ⁶	4,05 x10 ⁴	6,10 x10 ⁴	4,00 x10 ³	5,37 x10 ⁵	8,15 x10 ⁵
	Máximo	4,21 x10 ⁶	4,61 x10 ⁷	2,10 x10 ⁸	7,40 x10 ⁶	2,70 x10 ⁶	3,13 x10 ⁷	6,75 x10 ⁶
<i>Pseudomonas</i> spp (UFC/mL)	Média	6,61 x10 ⁵ a	1,78 x10 ⁶ a	1,69 x10 ⁶ a,b	2,31 x10 ⁵ a,b	2,53 x10 ⁵ b	9,26 x10 ⁵ A	5,11 x10 ⁵ a,A
	Mínimo	9,50 x10 ³	4,80 x10 ⁵	2,05 x10 ⁴	1,00 x10 ⁴	1,00 x10 ³	2,31 x10 ⁵	9,50 x10 ⁴
	Máximo	2,25 x10 ⁶	4,74 x10 ⁶	9,30 x10 ⁶	5,90 x10 ⁵	1,62 x10 ⁶	1,78 x10 ⁶	1,68 x10 ⁶
<i>P. fluorescens</i> (UFC/mL)	Média	6,00 x10 ³ a	8,42 x10 ⁴ a	6,20 x10 ² a	3,28 x10 ³ a	1,42 x10 ³ a	1,92 x10 ⁴ A	1,75 x10 ⁴ a,A
	Mínimo	4,00 x10 ³	4,00 x10 ²	1,20 x10 ²	5,60 x10 ²	4,00 x10 ¹	6,20 x10 ²	9,40 x10 ³
	Máximo	8,00 x10 ³	1,68 x10 ⁵	1,12 x10 ³	6,00 x10 ³	2,80 x10 ³	8,42 x10 ⁴	2,56 x10 ⁴

* Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05). ** Letras maiúsculas idênticas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa (p < 0,05).

A média da contagem de mesófilos variou de $3,45 \times 10^5$ UFC/mL a $3,68 \times 10^6$ UFC/mL, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre a contagem individual dos produtores e do leite de conjunto (Tabela 3). No período do presente estudo, apenas o produtor E, que melhor aplicava as boas práticas de ordenha (Tabela 1), apresentou contagem média dentro do permitido pela IN 62 ($6,0 \times 10^5$ UFC/mL). Porém, segundo a mesma normativa, a partir de 01 de julho de 2014 foi redefinido o parâmetro para Contagem Bacteriana Total (CBT) em no máximo $3,0 \times 10^5$ UFC/mL (BRASIL, 2011), deixando somente o produtor E próximo do limite legal, se considerarmos a contagem média de mesófilos ao longo das dez coletas (Tabela 3). O leite de conjunto apresentou contagens médias de mesófilos superior a 6×10^5 UFC/mL (Tabela 3), população está superior ao mínimo estabelecido pela IN 62 no período do estudo, bem como dos parâmetros atuais (BRASIL, 2011). Altas contagens de mesófilos denotam falhas no processo higiênico de obtenção do leite (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

A média da contagem de psicotróficos dos produtores variou de $4,05 \times 10^5$ a $3,13 \times 10^7$ UFC/mL (Tabela 3). O produtor E (Tabela 1) foi o que apresentou o leite com a menor contagem de psicotróficos e somente ele diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do leite de conjunto. A legislação não apresenta parâmetro para contagem de psicotróficos (BRASIL, 2011), porém a literatura demonstra que contagens acima de 10^6 UFC/ml, observada neste estudo no leite da maioria dos produtores e no leite de conjunto, já causam modificações no sabor, odor, rendimento e consistência do leite e derivados (MUIR, 1996; SANTOS et al., 2009). Ainda, segundo Thomas (1996), o tipo de micro-organismo psicotrófico presente tem importância superior a carga microbiana, pois cada micro-organismo apresenta sua velocidade de multiplicação e de produção enzimática.

A contagem média de *Pseudomonas* spp. dos produtores variou de $2,31 \times 10^5$ a $1,78 \times 10^6$ UFC/mL (Tabela 3) e de *P. fluorescens* variou de $6,20 \times 10^2$ a $8,42 \times 10^4$ UFC/mL. Fagundes et al. (2006) encontraram contagens próximas à deste estudo ($1,6 \times 10^5$ UFC de *Pseudomonas* spp./mL) em propriedade com manejo inadequado, apontando a qualidade da água como fator determinante nessa contaminação. O produtor E foi o único que diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) na contagem média no leite de *Pseudomonas* spp. em relação ao leite de conjunto do caminhão tanque. Segundo Fagundes et al. (2006), propriedades com manejo higiênico ruim possuem contagem média superior de *Pseudomonas* spp. em relação

às propriedades cujo manejo é adequado.

Tabela 4 - Relação entre micro-organismos no leite cru refrigerado coletado dos tanques de expansão de cinco produtores (A, B, C, D e E) e do caminhão-tanque de uma indústria beneficiadora da região de Londrina (PR), de junho/2013 a fevereiro/2014.

Produtor	% <i>Pseudomonas</i> spp. / Psicotróficos	% <i>P. fluorescens</i> / <i>Pseudomonas</i> spp.
A	41,84	0,91
B	18,74	4,73
C	5,40	0,04
D	15,20	1,42
E	62,47	0,56
Caminhão- tanque	17,93	3,42

Pseudomonas spp. representa a espécie Gram negativa mais comumente isolada em leite cru refrigerado (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; FAGUNDES et al., 2006; JAYARAO ;WANG, 1999; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006), porém neste estudo, este fato não foi constatado (Tabela 4). A população de *Pseudomonas* spp. em relação a de psicotróficos foi de 17,93% e *P. fluorescens* representou 3,42% do total de *Pseudomonas* spp. (Tabela 4), ambos no leite de conjunto entregue a indústria beneficiadora. Arcuri et al. (2008) no Brasil, identificaram do total de psicotróficos, Gram negativos isolados de leite cru refrigerado, 43% como sendo do gênero *Pseudomonas* spp., com a espécie *P. fluorescens* como a mais frequente (37,6%), seguida da espécie *P. putida*. Jayarao e Wang (1999) nos Estados Unidos, identificaram a espécie *P. fluorescens* como a predominante (29,9%) em leite refrigerado.

O tempo médio entre a coleta nos tanques de expansão e a chegada do leite ao laticínio foi de 6 horas,. Porém, foi verificado durante o período de coleta que o leite permaneceu no caminhão tanque por até 10 h, além de, em repetidas ocasiões, ficar armazenado mais de 48 h no tanque de expansão. Sabe-se que a temperatura e o período de armazenamento são determinantes, especialmente em relação aos micro-organismos psicotróficos, com aumento das contagens sob refrigeração ao longo do tempo (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009; SANTOS

et al., 2009). Porém, mesmo diante disto não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) para as populações estudadas entre a contagem média dos produtores e o leite recebido pela indústria. Assim, pode-se dizer que em uma linha curta como a estudada, a qualidade do leite produzido dependeu apenas da qualidade inicial do leite na propriedade.

CONCLUSÃO

O gênero *Pseudomonas* spp., bem como a espécie *P. fluorescens*, não foram os psicrotóxicos mais frequentes. O transporte a granel não influenciou na população final de mesófilos, psicrotóxicos, pseudomonas e *P. fluorescens* do leite cru refrigerado recebido pela indústria beneficiadora.

REFERÊNCIAS

- Andrade, N. J., Ajao, D. B., Zottola, E. A., 1998. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. J. Food Prot. 61, 1454-1458.
- AOAC. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical chemists. 1995. Sixteen ed Association of Official Analytical Chemists, Virginia.
- Acuri, E. F., Silva, P. D. L., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Lange, C. C., Magalhães, M. M. A., 2008. Counting, isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from refrigerated raw milk. Ciência Rural. 38, 2250-2255.
- Bramley, A.J., McKinnon, C.H., 1990. The microbiology of raw milk, in: Robinson, R.K. (Ed.), Dairy Microbiology. Elsevier Applied Science Publishers Ltda, New York, pp.163-208.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução Normativa 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução Normativa 62, de 29 de Dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.
- Cousin, M.A., 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk

and dairy products: a review. *J Food Prot.* 45, 172-207.

Fagundes, C.M., Fischer, V., Silva, W. P.; Carbonera, N., Araújo, M. R., 2006. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural.* 36, 568-572, 2006.

Frank, J. F., Christen, G. L., Bullerman, L. B., 1992. Tests for Groups of Microorganisms. 16 ed., in: Marshall, R. T. (Ed.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products.* American Public Health Association, New York, pp. 271-283.

Houghtby, G. A., Marturin, L. J., Koenig, E. K., Messer, J. W., 1992. Microbiological count methods. in: Marshall, R. T. (Ed.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products.* American Public Health Association, New York, pp. 213-244.

Jayarao B.M., Wang LA., 1999. Study on the prevalence of Gram- negative bacteria in bulk tank milk. *J Dairy Sci.* 82, 2620-2624.

Martins, P. R. G., Silva, C. A., Fischer, V., Ribeiro, M. E. R., Stumpf Junior, W., Zanela, M. B, 2006. Milk production and quality at the dairy region of Pelotas, Rio Grande do Sul State at different months of the year. *Ciência Rural.* 36, 209-214.

Muir, D.D. 1996. The shelf-life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. *J Soc Dairy Technol.* 49, 24-32.

Nornberg, M. F. B. L., Tondo, E. C., Brandelli, A, 2009. Psychrotrophic bacteria and proteolytic activity in refrigerated raw milk *Acta Scientiae Veterinariae.* 37, 157-163.

Pinto, C. L. O., Martins, L. M., Vanetti, M. C. D, 2006. Microbial quality of raw refrigerated milk and isolation of psychrotrophic proteolytic bacteria. *Ciênc. Technol. Aliment.* 26, 645-651.

Santos, P. A., Silva, M. A. P., Souza, C. M., Isepon, J. S., Oliveira, A. N., Nicolau, E. S. 2009. Effect of time and temperature or refrigeration in the development of refrigerimicroorganisms in cooled raw milk collected in the macroregion of Goiania, *Cienc. Anim. Bras.* 10, 1237-1245.

Shah, N. P. 1994. Psychrotrophic in Milk: a Review. *Milchwissenschaft.* 49, 432-437.

Silva, L. C. C., Beloti, V.; Tamanini, R., Ovidio, L., Mattos, M. R., Arruda, A. M. C. T., Pires, E. M. F., 2011. Tracking sources of microbiologic contamination of raw milk during milking process in dairy farms from Agreste of Pernambuco Semina: *Ciências Agrárias.* 32, 267-276.

Statsoft, Inc. 2008. *STATISTICA 8.0 for Windows* [Data analysis software system]. Tulsa: Statsof.

Thomas, S.B., 1996. Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk. *Milchwissenschaft.* 27, 270-275.

Vallin, V. M., Beloti, V., Battaglini, A. P. P., Tamanini, R., Fagnani, R., Anagela, A, H. L.; Silva, L. C. C., 2009. Milk quality improvement after implantation of good

manufacturing practices in milking in 19 cities of the central region of Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. 30, 181-188.

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J., 2006. *Dairy Science and Technology*, second ed. Marcel Dekker, New York.

Yamazi, A. K., Moraes, P. M., Viçosa, G. N., Ortolani, M. B. T., Nero, L., A., 2010. Producing practices applied on the control of microbiological contamination in raw milk. *Biosci. J.* 26, 610-618.

CONCLUSÃO

Os micro-organismos psicotróficos se tornaram uma preocupação a partir da introdução do frio na conservação do leite nas propriedades rurais e na indústria. Apesar de serem, em sua maioria, eliminados na pasteurização, as enzimas produzidas por eles são termoestáveis, e causam grandes prejuízos à indústria de leite UHT e derivados. A principal forma de minimizar a contaminação por esses micro-organismos é garantir que a matéria prima, ou seja, o leite cru tenha baixa contagem microbiana, através do uso de boas práticas de higiene na ordenha. Além disso, quanto menor o tempo de armazenamento e mais próxima de 4° C é a temperatura do leite, menor é o desenvolvimento dessas bactérias.

Durante muitos anos o gênero *Pseudomonas* spp. foi apontado na literatura como o psicotrófico mais frequente em leite cru refrigerado, sendo a *P. fluorescens* a principal espécie causadora de danos ao leite, através da produção de enzimas. No presente trabalho, foi demonstrado que essas não foram as bactérias principais, evidenciando que provavelmente hajam outros psicotróficos envolvidos na deterioração do leite cru e derivados. Desta forma, são necessários outros estudos que comprovem esse fato e que evidenciem quais os micro-organismos causadores de danos no leite cru refrigerado atualmente.

ANEXO

ANEXO A – Questionário para coleta de dados

Questionário

1. Identificação

Proprietário: _____

Propriedade: _____

Bairro: _____ Município: _____ UF: _____

Telefone: _____ Celular: _____

Data visita: _____ Responsável: _____

2. Atividade Leiteira

Mão de obra: Familiar () Contratada () Parceria () Outro _____

Tempo de Experiência _____ Nível Tecnológico Baixo () Médio () Alto ()

3. Rebanho

Vacas: n° cab _____ Raça _____ Idade Média _____

Novilhas: n° cab _____ Raça _____ Destino _____

Bezerras: n° cab _____ Raça _____ Destino _____

Bezerros: n° cab _____ Raça _____ Destino _____

Touro: n° cab _____ Raça _____ / IA () Repasse ()

4. Sanidade do Rebanho

Brucelose: Vacina () Idade Bezerras: _____ Exame: _____

Tuberculose: Exame: _____ Febre Aftosa: Vacina ()

Mastite subclínica () Frequência: _____ n° cab: _____

Produto: _____ Descarte animal: _____

Mastite clínica () Frequência: _____ n° cab: _____

Produto: _____ Descarte animal: _____

Carrapatos () Produto: _____ Freq: _____

Verminoses () Produtos: _____ Freq: _____

Carência produtos: Descarte leite () Consumo () Bezerro () Outro _____

5. Instalações

5.1 Mangueira

() Piso () Chão batido () Cobertura () Espaço suficiente () _____

5.2 Bezerreiro

Piso () Chão batido () Cobertura () Espaço suficiente () _____

5.3 Sala espera

Piso () Chão batido () Cobertura () Espaço suficiente () _____

5.4 Sala ordenha

Água encanada () Canaleta () Declive () Cobertura () Piso ()

Chão batido () Cobertura () Espaço suficiente () _____

5.5 Sala do resfriador

Piso () Chão batido () Cobertura () Água encanada () Cloro () _____

Tela porta () Tela Janela () Revestimento Cerâmico ()

6. Equipamento e Utensílios

Tanque de expansão () Coletivo () Individual () Litros: _____
 Tanque de imersão () Coletivo () Individual () Litros: _____
 Latões () Adequados () Inadequados () Litros: _____
 Concha () Inox () Plástico () Outro: _____
 Régua () Inox () Plástico () Outro: _____
 Coador () Inox () Plástico () Outro: _____

7. Produção

Vacas lactantes: nº cab _____ Vacas secas: nº cab _____
 Estágio lactação: nº cab Início _____ Meio _____ Final _____
 Produção média: Litros/cab/dia: _____ Litros/dia total: _____
 Meses de lactação (média): _____ Mês secagem: _____

8. Ordenha

Tipo: Manual () Mecânica () Balde ao pé ()/nº conj: _____ Canalizada ()
 Bezerro ao pé () Apoio () Sem bezerro () Outro: _____
 Ordenhas/dia: _____ Horário: _____ Ordenhador: _____
 Limpeza tetos: Água () Pano () Papel Toalha () Outro _____
Predipping () Produto: _____ Concent.: _____
 Adequado () Inadequado () Obs: _____
Posdipping () Produto: _____ Concent.: _____
 Adequado () Inadequado () Obs: _____
 Três primeiros jatos () Local: _____
 Caneca fundo escuro () Frequência: _____
 CMT () Frequência: _____
 Fonte de água: _____ Cloro () Concent: _____
 Alimentação: na ordenha () antes ordenha () pós ordenha ()
 Animais com mastite: _____

9. Coleta do leite

Diária () Cada 48 h () Outro: _____ Empresa: _____
 Teste Alizarol () Coleta amostra individual () Frequência: _____

10. Limpeza de Utensílios e instalações

10.1 Ordenhadeira:

Lavagem: Produto: _____ Concent.: _____
 Lavagem: Produto: _____ Concent.: _____
 Fonte água: _____ Quente () Fria () Cloro () Concent: _____
 Escovas apropriadas () Desmonta para lavar () Troca borrachas () _____

10.2 Latões:

Lavagem: Produto: _____ Concent.: _____
 Lavagem: Produto: _____ Concent.: _____
 Fonte água: _____ Quente () Fria () Cloro () Concent: _____
 Esponja Macia () Palha aço () Antes Ordenha () Após Ordenha ()

Boca para cima () Boca para baixo () Local: _____

10.3 Tanque:

Lavagem: Produto: _____ Concent.: _____

Lavagem: Produto: _____ Concent.: _____

Fonte água: _____ Quente () Fria () Cloro () Concent.: _____

Esponja Macia () Palha aço () Entrada leite () Saída leite ()

Boca do Tanque () Tampa () Haste () Fundo ()

10.4 Sala de ordenha:

Lavagem: Produto: _____ Concent.: _____

Fonte água: _____ Cloro () Concent.: _____

Escova () Água residual () Frequência: _____ Pré () Pós () ordenha

11. Higiene do Ordenhador

Roupa: limpa () suja () Cabelo: preso () solto () Avental () Botas ()

Unhas: aparadas () compridas () Mãos: limpas () sujas () Banho ()

Mãos: Papel toalha () Pano () Barba ou bigode ()

Costumes Inadequados () _____