



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

CONTAGEM DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS E DIFERENCIAÇÃO COMPARATIVA PÓS-TERMIZAÇÃO EM LEITES PASTEURIZADOS

Priscilla Bezerra BASTOS¹; Jade Marinho GONSALVES¹; Larissa M. Nunes de ALMEIDA¹; Ricardo Soares MARTINS²; Eliane Rolim FLORENTINO¹

¹UEPB – Universidade Estadual da Paraíba/Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos – NUPEA/Departamento de Química, Av. das Baraúnas, 351, Campus Universitário Bodocongó - Campina Grande PB.

²NUPPA - Núcleo de Pesquisa e Processamento em Alimentos Centro Tecnologia Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa PB

RESUMO

Buscando melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil, mudanças no setor lácteo estão sendo implantadas, dando-se ênfase à refrigeração do leite (4-7°C) nas propriedades produtoras e ao transporte a granel em caminhões isotérmicos. Entretanto, falhas processuais e operacionais têm ocasionado danos à qualidade do produto por atuar de forma seletiva favorecendo a flora psicotrófica, capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, que mantêm sua atividade após a pasteurização comprometendo a qualidade do leite. Com o objetivo de investigar presença de bactérias psicotróficas no leite pasteurizado foi realizado um controle microbiológico normativo e comparativo desses microrganismos. Durante o estudo foram quantificadas bactérias psicofílicas e psicotróficas. Em seguida o leite foi termizado a 60°C/15 minutos para eliminação da flora vegetativa termolábil e contagem para comparação confirmativa correlativa pós-termização para diferenciação característica e número da flora psicotrófica presente no leite pasteurizado. A contagem desses microrganismos mostra a termoresistência e sobrevivência após tratamento térmico seguido de refrigeração no sistema HTST. No leite empacotado são células termoresistentes que sobreviveram ao beneficiamento e conseguem crescer nas temperaturas de estocagem do leite (2-10°C). O controle analítico de microrganismos com termização da amostra a 60°C seguido de incubação a 21°C permite avaliação microbiológica da flora de degradação do leite pasteurizado da nossa região.

Palavra chave: qualidade do leite termizado; avaliação microbiológica;

1 INTRODUÇÃO

De acordo com as normas da Internacional Dairy Federation, os psicotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem desenvolver-se a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento. Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração (1 a 4 semanas), por provocar uma gradativa seleção microrrogânica psicotrófica.

Segundo SOARES, (2004) os microrganismos psicotróficos contribuem para deterioração do leite de duas formas: pela produção de enzimas proteolíticas e



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

lipolíticas que são secretadas a baixas temperaturas e provocam alterações físicas, químicas e organolépticas mesmo após o tratamento térmico.

Os psicotróficos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos, apresentando aproximadamente 15 gêneros diferentes que foram isolados do leite e produtos derivados (MARTINS et. al, 2004). Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, vibrios, formadores ou não de esporos; assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios. Fazem parte deste grupo tanto bactérias Gram-negativas – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp - como bactérias Gram-positivas: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Alguns gêneros de bolores e leveduras também apresentam características do grupo dos psicotróficos e podem causar problemas de qualidade do leite sendo o gênero *Pseudomonas* o predominante no leite armazenado a 4°C por mais de 8-11 dias (SANTANA, 2001).

Uma importante característica dos psicotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log., de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes microrganismos (SANTOS e FONSECA, 2003).

Uma ampla gama de problemas de qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana como: alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e geleificação do leite longa vida (DATTA e DEETH (2001)

CUNHA e BRANDÃO, (2000) citam que as enzimas termorresistentes originadas de psicotróficos são responsáveis pelo desenvolvimento de sabor residual no leite pasteurizado, e pela deficiência de determinados processos na



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

produção de queijos, como a perda de rendimento e aparecimento de defeitos. Dessa forma, causando grandes perdas econômicas para as indústrias de laticínios. 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 aos lipídeos 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 a temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas. As lipases produzidas por bactérias psicrotróficas são resistentes à temperatura empregada na pasteurização (72-76°C por 15-20 segundos) e no tratamento com temperatura ultra-alta (142-145°C por 4-6 segundos). Portanto, essas enzimas apresentam grande importância na qualidade e na vida de prateleira de produtos lácteos como queijos, leite longa vida e creme de leite (PINTO et al, 2004).

Com o objetivo de investigar a presença de bactérias psicrotróficas foi realizado um controle microbiológico normativo e comparação correlativa pós-termização para diferenciação característica e número da flora presente em amostras de leite pasteurizado comercializado em Campina Grande PB.

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta das Amostras

No período de setembro a novembro de 2011 foram estudadas três marcas diferentes de leites pasteurizado as quais foram identificadas com A; B e C. As amostras foram coletadas semanalmente, sempre no mesmo supermercado para garantir as mesmas condições de refrigeração e armazenamento. Em seguida foram



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

encaminhadas para o laboratório de Microbiologia do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA/DQ/CCT), onde foi realizada a contagem padrão em placas (CPP) de microrganismos psicofílicos e psicrotróficos,

2.2 Métodos Analíticos

2.2.1 Contagem padrão de microrganismos psicofílicos

Para contagem de microrganismos psicofílicos, foram preparadas diluições decimais até 10^2 e adicionado o meio Agar padrão para contagem (APC) incubada a 7°C por 10 dias.

2.2.2 Contagem padrão de microrganismos psicrotróficos

Para contagem de microrganismos psicrotróficos utilizou-se a contagem de microrganismos psicrotróficos modificada por OLIVEIRA e PARMELEE (1976), preparando diluições decimais até 10^2 , adicionado o Ágar padrão para contagem (APC)

O binômio tempo/temperatura (10 dias/ 7°C) utilizado na incubação das placas neste método permite que apenas psicrotróficos se multipliquem facilitando a sua enumeração (PEREIRA Jr. *et al.*, 2002). OLIVEIRA e PARMELEE (1976) desenvolveram uma contagem de psicrotróficos modificada que possibilita a enumeração dos microrganismos em menor tempo. A modificação realizada foi simplesmente mudar o binômio tempo/temperatura de incubação das placas para $21^\circ\text{C}/25$ horas (**Psicrotróficos I**).

2.2.3 Teste Confirmativo dos microrganismos psicrotróficos

A amostra foi termizada a 65°C durante 15 minutos resfriada em água corrente. Nessa amostra foi realizada a determinação de microrganismos psicrotróficos, utilizando 1,0 mL da amostra e 1,0 mL da diluição 10^{-1} , incubadas a



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

21°C/25 horas (PEREIRA Jr. *et al.*, 2002). OLIVEIRA e PARMELEE (1976).
(Psicrotróficos II).

As determinações realizadas em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade de um produto está diretamente relacionada com a qualidade da matéria-prima empregada na sua elaboração. A microflora inicial influencia grandemente na qualidade do leite cru e conseqüentemente nos produtos com ele fabricados. As técnicas usuais de manuseio de leite cru freqüentemente resultam em altas contagens de psicrotróficos antes da fabricação de produtos lácteos, que através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas produzem substâncias indesejáveis aos produtos (FONSECA e SANTOS, 2001).

Apesar da importância dos psicrotróficos, o Ministério da Agricultura não estipula um padrão de qualidade e identidade do leite, baseado na contagem de unidades formadoras de colônia destes microrganismos. No Brasil não existe uma regulamentação sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura* destinado à fabricação de produtos lácteos específicos. Mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação brasileira para a conservação do leite na fonte de produção e no estabelecimento industrial pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado (MARTINS *et al.*, 2004).

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da contagem padrão de bactérias psicrófilas e psicrotróficas sem **(Psicrotróficos I)** e com termização **(Psicrotróficos II)**. das 3 diferentes marcas de leite pasteurizado analisadas.

Tabela 1. Valores médios da contagem padrão de bactérias psicrófilas e psicrotróficas sem **(Psicrotróficos I)** e com termização **(Psicrotróficos II)**. das 3 diferentes marcas de leite pasteurizado



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

MARCAS DE LEITE	PSICRÓFILOS	PSICROTRÓFICO S sem termização (Psicrotróficos I).	PSICROTRÓFICOS com termização (Psicrotróficos II).
A	$3,9 \times 10^3$ UFC/mL	$3,7 \times 10^4$ UFC/mL	$4,6 \times 10^3$ UFC/mL
B	$9,0 \times 10^4$ UFC/mL	$6,2 \times 10^3$ UFC/mL	$5,9 \times 10^2$ UFC/mL
C	$1,9 \times 10^3$ UFC/mL	$3,6 \times 10^3$ UFC/mL	$1,3 \times 10^2$ UFC/mL

Para contagem padrão de bactérias psicrófilas o leite da marca “A” apresentou valor médio de $3,9 \times 10^3$ UFC/mL. A marca “B” $9,0 \times 10^4$ UFC/mL, número populacional no limite mínimo de eugenesia térmica (7°C). Valores de $1,9 \times 10^3$ UFC/mL foram encontrados na marca “C”.

A contagem de **psicrotróficos I** (sem termização) da marca “A” foi de $3,7 \times 10^4$ UFC/mL representando o número de microrganismos psicrotróficos na temperatura ideal 21°C. A marca “B” apresentou valores de $6,2 \times 10^3$ UFC/mL e a marca “C” $3,6 \times 10^3$ UFC/mL. Em todos os resultados certamente encontram-se mesófilos termoresistentes crescendo em faixa eugênica baixa e resistente ao beneficiamento do leite.

De acordo com a contagem de microrganismos **psicrotróficos I** (sem termização), em condições de incubação a 21°C, são microrganismos que resistiram ao tratamento HTST e apresentaram multiplicação celular exatamente na média térmica dos balcões frigoríficos. Esses microrganismos são oriundos de leite produzidos em regiões áridas, suportam a média térmica diurna e noturna da região, através do leite recebido nas unidades coletoras – entrepostos ou tanques de refrigeração são submetidos a resfriamento, normalmente lentos em tanques de expansão, novamente resfriado para estocagem na usina, beneficiados em HTST a



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

75°C/20 segundos resfriados, empacotados, transportados e expostos no mercado em balcões frigoríficos. Esses microrganismos são termoresistentes em fase vegetativa ou latente, adaptados ao crescimento mesófilo baixo (18-25°C), são indicativos de falhas operacionais, maquinário deficiente de leite misturado ao leite de retorno do mercado.

Quanto aos microrganismos **psicrotróficos II** (com termização 60°C/15min), os leites das marcas “A” “B” e “C” apresentaram contagem padrão de $4,6 \times 10^3$ UFC/mL; $5,9 \times 10^2$ UFC/mL; $1,3 \times 10^2$ UFC/mL, respectivamente. A termização empregada eliminou os mesofilos termolábeis (não resistente ao calor) adaptados às condições psicrotróficas (21°C), mas sem resistência ao tratamento térmico utilizado como ponto diferenciativo analítico. Os resultados quantificam psicrotróficos termoresistentes adaptados às variações térmicas de tratamento/beneficiamento. Esses microrganismos representam o real risco para as indústrias e consumidor, pois misturado ao leite a ser beneficiado, seu reprocessamento agrega contaminantes psicrotróficos em todo circuito da usina.

Desamases e Gueguen (1997) estudando microrganismos psicrotróficos na superfície das tetas de vacas recém ordenhadas já encontraram altas contagens como $2,1 \times 10^4$ UFC/mL e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL. ANTUNES (2002) obteve resultados médios de $4,8 \times 10^4$ UFC/mL quando o leite encontrava-se ainda nas granjas leiteiras. Os resultados encontrados por esses autores reforçam a idéia de que se um controle inicial nas próprias granjas leiteiras não for realizado, o leite sofrerá prejuízos na qualidade mesmo estando sobre refrigeração.

Santos e Fonseca, (2003), ao quantificar, isolar e caracterizar bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado, produzido na região da Zona da Mata de Minas Gerais e Sudeste do Rio de Janeiro, analisaram amostras de leite coletadas de 20 tanques coletivos e 23 tanques individuais. As contagens de bactérias psicrotróficas nas amostras de leite para os dois tipos de tanques de refrigeração variaram entre 10^2 e 10^7 UFC/mL, porém, um maior número de tanques



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

coletivos apresentou contagens acima de 1.0×10^5 UFC/mL. Foi verificada a predominância de bactérias psicotróficas gram-negativas (81,2%) e relataram que as *Pseudomonas* foi o gênero mais isolado e *P. fluorescens* foi a espécie predominante. A maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade proteolítica e/ou lipolítica a temperaturas de refrigeração de 4°C, 7°C e 10°C, evidenciando seu alto potencial de deterioração do leite

4 CONCLUSÃO

Micro-organismos resistentes ao beneficiamento do leite, em condições **psicrófilas** de crescimento, sintetizantes de proteases degradativas nas temperaturas de estocagem do leite pasteurizado.

Os resultados da contagem microbiana a 21°C (**psicotróficos I**) demonstram condições de crescimento dos sobreviventes do beneficiamento térmico do leite (HTST), ao resfriamento do circuito (4°C) e crescem nas condições térmicas dos balcões frigoríficos do mercado. A condição incubativa térmica a 21°C favorece o crescimento mesófilo termoresistente, dos psicotróficos em condições multiplicativas e aos psicrófilos em alta faixa térmica de crescimento.

Após termização (**psicotróficos II**) os micro-organismos sobreviventes são resistentes à dupla termização. Eliminados os termolábeis oriundos de pós contaminação nos circuitos, esses sobreviventes apresentam flora de condições mesófilas, psicotróficas e psicrófilas.

A termização das amostras a 65°C/5min favorece a interpretação analítica no controle microbiológico dos contaminantes lácteos da nossa região.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, V. C.; JUNIOR, W. M. S.; VALENTE, P. P.; BARROS, A. P.; CONDE, C. B.C.; ROSA, R.; BERTOLDI, M. C.; SARAIVA, C.; FERREIRA, C. L. L. F. Contagem



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Total de Microrganismos Mesófilos e de Psicotróficos no Leite Cru e Pasteurizado, Transportado via Latão ou Granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios**

Cândido Tostes. Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 199, jul./ago. 2002.

BRASIL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 4 ed. São Paulo, 1018p 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 20/09/2002 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de setembro de 2002.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicotróficas. **Indústria de laticínios**. Jul/ago, p. 71-73, 2000.

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

MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O.; VANETTI, M. C. D.; MEZÊNCIO, J. M. S.; Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 61, jul./ago. 2004.

PINTO, C. L. O.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Bactérias Psicotróficas Proteolíticas e Potencial Determinador a Temperaturas de Refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 110-117, jul./ago. 2004.

SANTANA, E. H. W. Contaminação do leite por microrganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira. 1v. 78p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina – Ciência Animal. nov, 2001.



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite.

Revista CBQL, v.19, p. 12-15, 2003.

SOARES, P. V.; PRATA, L. F. Estimativa rápida da carga de microrganismos psicotróficos em leite cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais eletrônico...** [CD-ROM],

Passo Fundo:

OLIVEIRA, J. S.; PARMELEE, C. E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 39, n. 4, p.

269-272,1976.