



Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Centro de Tecnologia  
Departamento de Engenharia Química  
Programa de Pós-graduação em Engenharia  
Química



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS  
PSICROTRÓFICAS PRESENTES NO LEITE  
CRU REFRIGERADO.**

**PRISCILLA DINIZ LIMA DA SILVA**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. **Dr<sup>ª</sup>. Margarida Maria dos Anjos Magalhães**  
Co-Orientadora: **Dr<sup>ª</sup>. Edna Froeder Arcuri**

Natal / RN  
Dezembro / 2005



Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte  
Centro de Tecnologia  
Departamento de Engenharia Química  
Programa de Pós-graduação em Engenharia  
Química



**AVALIAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE  
ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS  
PRESENTES NO LEITE CRU REFRIGERADO.**

Priscilla Diniz Lima da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Dr<sup>a</sup>. Margarida Maria dos Anjos Magalhães  
Dr<sup>a</sup>. Edna Froeder Arcuri  
Orientadoras

**Natal / RN  
Dezembro / 2005**

**SILVA, Priscilla Diniz Lima da.** – Avaliação, Identificação e Atividade Enzimática de Bactérias Psicotróficas Presentes no Leite Cru Refrigerado.

Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração: Engenharia de Processos. Natal – RN, Brasil.

Orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margarida Maria dos Anjos Magalhães (DEQ/UFRN)

Dr<sup>ª</sup>. Edna Froeder Arcuri (PESQUISADORA/CNPGL)

## **RESUMO** -

O processo de conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração por períodos prolongados pode acarretar perda de qualidade do leite e, conseqüentemente, de seus produtos derivados, fato associado ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicotróficas, as quais podem se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C. Estes microrganismos geralmente são eliminados durante o tratamento térmico do leite, porém suas enzimas proteolíticas e lipolíticas são termoestáveis, podendo resistir até mesmo ao tratamento UAT e permanecerem ativas causando perda de qualidade dos produtos processados. Recentemente a INSTRUÇÃO NORMATIVA 51, estabelece que o leite deve ser refrigerado e armazenado na propriedade rural, o que aumentou a importância desse grupo de bactérias. Neste trabalho, foram isoladas e identificadas bactérias contaminantes de leite cru refrigerado proveniente de 20 tanques comunitários e 23 tanques individuais de propriedades leiteiras da região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e sudeste do Rio de Janeiro. Diluições selecionadas foram plaqueadas em agar padrão e após incubação a 7°C/10 dias, 5 colônias foram isoladas em placas contendo agar nutriente, com incubação a 21°C/24 h. Os isolados foram identificados de acordo com a morfologia, coloração de Gram, produção de catalase, oxidase, metabolismo fermentativo/oxidativo, crescimento em meio Mac Conkey, reação de KOH 3%, hidrólise da arginina, motilidade, produção de H<sub>2</sub>S e indol em meio SIM e presença de esporos, e pelo Sistema API 20E, API 20NE, API Staph, API Coryne ou API 50 CH (BioMérieux). O sistema API foi repetido para 50% dos isolados para garantir a reprodutibilidade dos resultados. A identificação em nível de espécie foi considerada quando o programa APILAB indicou identidade ≥ 75%. Foram obtidos 309 isolados, sendo 250 Gram negativos e 59 Gram positivos. Os 250 isolados Gram negativos obtidos foram identificados como: *Acinetobacter* spp. (39), *Aeromonas* spp. (07), *A. Hydrophila* (16), *A. sobria* (1), *A. caviae* (1), *Alcaligenes faecalis* (1), *Burkholderia cepacia* (12), *Chryseomonas luteola* (3), *Enterobacter* sp. (1), *Ewingella americana*(6), *Hafnia alvei* (7), *Klebsiella* sp. (1), *Klebsiella oxytoca* (10), *Yersinia* spp. (2), *Methylobacterium mesophilicum* (1), *Moraxella* spp. (4), *Pantoea* spp. (16), *Pasteurella* sp. (1), *Pseudomonas* spp. (10), *P. fluorescens* (94), *P. putida* (3), *Serratia* spp. (3), *Sphigomonas paucomobilis* (1). Cinco isolados não puderam ser identificados por meio dos testes utilizados. *Pseudomonas* foi o gênero mais isolado (43%) sendo *Pseudomonas fluorescens* a espécie predominante (37,6%), o que corrobora dados da literatura. A produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas foi avaliada qualitativamente pela presença de halo em torno da colônia em agar caseinato e agar tributirina durante 72 horas a 21°C e 10 dias a 4°C, 7°C e 10°C. Do total de 250 Gram negativos, 104 foram identificados como *Pseudomonas* spp., das quais 60,57% apresentaram atividade proteolítica e lipolítica nas quatro temperaturas estudadas. 20%

das espécies pertencentes aos gêneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, demonstraram apenas atividade lipolítica nas quatro condições estudadas. Dos 59 isolados Gram-positivos obtidos, foram identificados os seguintes gêneros: *Kurthia* spp (7), Levedura (1), *B. stearothermophilus* (1), *Bacillus coagulans* (1), *Bacillus lentus* (1), *Brevibacterium* spp (1), *Cellum/Microbacterium* (6), *Staphylococcus* spp (3). Trinta e sete isolados não puderam ser identificados por meio dos testes utilizados. Alguns isolados apresentaram atividade enzimática em uma ou mais das quatro temperaturas estudadas: Gram-positivos- 30,51% foram proteolíticas a 7°, 10 e 21°C e lipolítica a 10°C; 8,47% foram proteolíticos a 7°, 10° e 21°C; 8,47% foram lipolítica nas quatro temperaturas estudadas; 3,38% proteolíticos só a 21°C e somente um isolado tiveram atividade proteolítica a 4°C e seis atividade lipolítica a esta mesma temperatura. Gram negativos - 4% foram proteolítico e lipolítico a 7°, 10° e 21°C; 10% proteolíticas a 10°C; 4,4% lipolítico a 4°, 7° e 21°C; 6,4% foram proteolítico e lipolítico a 10° e 21°C e também lipolítico a 4° e 7°C. Estes resultados são consistentes com os de outras pesquisas, em que também foram constatados que espécies do gênero *Pseudomonas* representam a microbiota psicotrófica deterioradora mais freqüente do leite refrigerado.

**PALAVRAS-CHAVES:** Leite cru; psicotróficos; protease; lipase.

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarida Maria Magalhães dos Anjos (DEQ/UFRN)**

Membros: **Dr<sup>a</sup>. Edna Froeder Arcuri (PESQUISADORA/CNPGL)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina da Silva Pedrini (DEQ/UFRN)**

**Prof. Dr. Celso José de Moura (UFG)**

## ABSTRACT

Extended storage of refrigerated milk can lead to reduced quality of raw and processed milk, which is a consequence of the growth and metabolic activities of psychrotrophic bacteria, able to grow under 7°C or lower temperatures. Although most of these microorganisms are destroyed by heat treatment, some have the potential to produce termo-resistant proteolytic and lipolytic enzymes that can survive even UHT processing and reduce the processed products quality. Recently, the IN 51 determined that milk should be refrigerated and stored at the farm what increased the importance of this group of microorganisms. In this work, psychrotrophic bacteria were isolated from 20 communitarian bulk tanks and 23 individual bulk tanks from dairy farms located at Zona da Mata region of Minas Gerais State and from southeastern Rio de Janeiro. Selected milk dilutions were plated on standard agar and after incubation for 10 days at 7°C, five colonies were isolated, firstly using nutrient agar and after using McConkey agar for 24 hours at 21°C. The isolates were identified by morphology, Gram stain method, catalase production, fermentative/oxidative metabolism and by API 20E, API 20NE, API Staph, API Coryne or API 50 CH (BioMerieux). In order to ensure reproductibility, API was repeated for 50% of the isolates. Species identification was considered when APILAB indexes reached 75% or higher. 309 strains were isolated, 250 Gram negative and 59 Gram positive. 250 Gram negative isolates were identified as: *Acinetobacter* spp. (39), *Aeromonas* spp. (07), *A. Hydrophila* (16), *A. sobria* (1), *A. caviae* (1), *Alcaligenes feacalis* (1), *Burkholderia cepacia* (12), *Chryseomonas luteola* (3), *Enterobacter* sp. (1), *Ewingella americana*(6), *Hafnia alvei* (7), *Klebsiella* sp. (1), *Klebsiella oxytoca* (10), *Yersinia* spp. (2), *Methylobacterium mesophilicum* (1), *Moraxella* spp. (4), *Pantoea* spp. (16), *Pasteurella* sp. (1), *Pseudomonas* spp. (10), *P. fluorescens* (94), *P. putida* (3), *Serratia* spp. (3), *Sphigomonas paucomobilis* (1). Five isolates kept unidentified. *Pseudomonas* was the predominant bacteria found (43%) and *P. fluorescens* the predominant species (37.6%), in accordance with previous reports. Qualitative analysis of proteolytic and lipolytic activity was based on halo formation using caseinate agar and tributirina agar during 72 hours at 21°C and during 10 days at 4°C, 10°C and 7°C. Among 250 Gram negative bacteria found, 104 were identified as *Pseudomonas* spp. and 60,57% of this group showed proteolytic and lipolytic activities over all four studied temperatures. 20% of *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Methylobacterium*, *Moraxella* presented only lipolytic activity. Some isolates presented enzymatic activity in one or more studied temperatures. Among Gram positive bacteria, 30.51% were proteolytic and lipolytic at 10oC, 8.47% were proteolytic at 7oC, 10oC, and 21oC, 8.47% were proteolytic at all studied temperatures (4oC, 7oC, 10oC and 21oC) and 3.38% were proteolytic only at 21oC. At 4oC, only one isolate showed proteolytic activity and six isolates were lipolytic. In relation to Gram negative microorganisms, 4% were proteolytic and lipolytic at 7oC, 10oC and 21oC, 10% were proteolytic at 10oC and 4.4% were lipolytic at 4oC, 7oC, 10oC and 21oC, while 6.4% of all isolates were proteolytic and lipolytic at 10oC and 21oC as well as lipolytic at 4oC and 7oC. These findings are in accordance with previous researches that pointed out *Pseudomonas* as the predominant psychrotrophic flora in stored refrigerated raw milk.

Key words: Raw milk, psychrotrophic, protease, lipase.

## Dedicatória

À Deus que me deu como maior presente a VIDA! E nos deixou os melhores conselhos!  
E me disse: “Não podemos nos dar por vencidos, mas aproveitar cada situação para  
confiar em Deus e amadurecer”.

"A nossa presente tribulação, momentânea e ligeira, nos proporciona um peso eterno de  
glória incomensurável" (2 Cor 4,17).

“Deus tem um propósito por trás de cada problema. Jesus nos advertiu que teríamos  
problemas no mundo” (Jo 16,33).

À minha Mainha, por estar sempre tentando nos oferecer o melhor! Sei que temos  
nossas diferenças, mas EU TE AMO muito!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o dom da sabedoria, sem a sua preciosa presença nada seria possível. Ele esteve presente em todos os momentos da minha de forma real e marcante. Sei que com ajuda deste Pai maravilhoso eu mudei e também sei que o que foi construído não será destruído, pois tudo que é feito com amor, dedicação e respeito têm seu lugar de destaque, de lembrança, onde quer que estejamos! E eu fiz meu trabalho assim!...

À minha família pelo incentivo, paciência, apoio e aconchego, compartilhando os momentos de alegria e me ajudando a vencer e superar todos os momentos difíceis, a distância, enfrentados durante a realização deste trabalho.

À amiga e professora Dr<sup>a</sup> Margarida Maria Magalhães dos Anjos pela orientação deste trabalho, por mais uma vez fazer parte de minha formação profissional, pelo apoio dedicado, ensinamentos compartilhados, pela motivação constante, compreensão, pela amizade construída há anos e principalmente pela confiança depositada em mim.

A Dr<sup>a</sup> Edna por mais esta oportunidade de aperfeiçoamento, pela orientação e ensinamentos na execução deste trabalho junto a Embrapa Gado de Leite.

A amiga Dr<sup>a</sup> Márcia Pedrini pela amizade, paciência, por todos os momentos de dúvidas, angústias e risadas e inúmeras sugestões as quais enriqueceram o conteúdo desta pesquisa. E por dizer que sou uma PENTELHA, sei que é de coração.

A amiga Dr<sup>a</sup> Roberta Targino, para os íntimos Rob, pela amizade, por ser a primeira a me encaminhar na pesquisa, pela paciência, conselhos e esclarecimentos nos momentos da qualificação.

Ao Dr. Jonh meu painho gaúcho! Meu grande e eterno amigo e confidente.

A Carla pelos conselhos, quando mais ninguém tinha coragem de falar, ela me chamada e conversávamos.

Ao Dr. Renaldi por todas as oportunidades, inclusive no PAS. Muito trabalho, mas acho que acabei me superando e isto foi o diferencial em muita coisa!

A Dra. Cida por esta disposta a sempre tirar uma ou outra dúvida.

Ao Marcos, quantas vezes eu cheguei desesperada porque não sabia fazer um teste ou meio e ele me ajudava!

A Liana, Paula, Carol, Gilmara, Nádia, Emilia pela amizade, cumplicidade e pelas vezes que tive que trabalhar fins de semanas e elas estavam ali me ajudando, e foram muitos! Quando fui fazer um encontro do grupo de jovens, a viagem para o PAS, enfim tantas e tantas horas.

Ao Arnaldo, Wanghriston, Alessandra, Ahbia, Daniela e Fabíola pela amizade enfim toda galera do Laboratório de Microbiologia do Leite.

A Catita, minha grande e eterna amiga de confidencias, lágrimas, noites de trabalhos, desabafos por coração machucando, preocupações no trabalho, medo e angústias. Mesmo com aquele jeitinho relax. Sei que ela se preocupa comigo e estava disposta a esta sempre perto e me aconselhar, dar um abraço amigo...é difícil descrever como foi todo este tempo morando com você. Aprendi muito!

Ao Marcio, amigo para muitas horas! Brigamos muito, brigamos mesmo! Mas no fim sempre nos entendíamos muito bem! Acho que os outros nunca entenderão a nossa amizade, às vezes nem eu entendo!

Ao Leo Grav meu eterno e grande amigo pela amizade, confiança, lágrimas compartilhadas, pelas tardes e noites de filmes, almoços, confiança, por dizer que sentirá minha falta!

Ao Leo Zaquine, por toda amizade, carinho, confiança, lágrimas compartilhadas, confiança, por acreditar e confiar em mim acima de tudo!

A Marlice e todos de sua família por me receber em sua casa como um membro da família, por acreditar no meu trabalho. Pela amizade e pela fé.

A Fátima (pesquisadora da embrapa de Fortaleza) pela amizade, confiança, cumplicidade e por acreditar em meu potencial.



Ao Dr. Rui por toda ajuda nas análises estatísticas! E todos de sua equipe: Gabi e Henrique.

Ao Newton, pela ajuda em todas as correções das cartilhas do PAS e dissertação e amizade.

A Pricila e Gerusa pela amizade, pela presença nos momentos alegres, sempre serão uma grande recordação!

Ao Carlos Moura por todos os galhos quebrados e amizade!

A Ivete Martinez pela amizade e carinho.

Aos estagiários do Marcio por toda amizade e cumplicidade: Vivi, Leandro, Rafael, Diogo, pela amizade: Daniel, Dedi, Marcinha (limpeza), Marcinha Prata, Cris (fisiologia vegetal), Chico (avalista no apt), a galera do laboratório de qualidade do leite (Cris, Mônica, Guilherme, Leandro, Andréia, Luciano, Rick...), Dra. Coletta, Carlos Alberto, Aryeverton, Stock, Ângela (que trabalha com o Leo Grav), Fernando, Bárbara que trabalha com Marlice, Sandrinha Pinto, Sandra Tassi e Lucilene, Claret, Célio Freitas e Fabiana (mãe do Caio).

Ao Ênio e a Séfora Andréia pela amizade, carinho e atenção família.

Ao Dr. Pedro, Marne, Rita e a Inês (pela amizade) por acreditarem no meu trabalho e pelo compromisso com PAS.

A galera do Grupo de Jovens, canção nova!!! Vocês foram minha família!! E serão sempre! Encontrei a partir de vocês Deus! Um Deus vivo e presente em cada momento de minha vida! Como diria meu melhor amigo: os melhores amigos são a família que nós podemos escolher! Escolhi vocês!!!

A Cris uma grande amiga! Dizem que amigos nascidos na fé serão sempre amigos, e que nem à distância, as dificuldades, nada consegue separá-los! Pois estão unidos em Cristo! Você é uma dessas pessoas iluminadas!

Ao Paulo Adonai pela amizade e que Deus continue a fazer maravilhas em sua vida!!

A Mamãe Sinara, obrigada por me dar um irmãozinho chamado Miguel.

A Mônica, Rô e família por todo carinho, amizade!

A Andréa da Engenharia Bioquímica pela amizade, força e por me ajudar na formatação da minha dissertação.

A Andréia pela amizade, cumplicidade e a fé em um único Deus.

A Bianca e o Charles pela recente amizade, mas algo verdadeiro...pelos momentos compartilhados na fé e na esperança de um dia melhor.

A todos os amigos da UFRN, que mesmo longe estavam presentes em cada segundo.

A todos que fazem parte da Embrapa Gado de Leite!!! Meu muitíssimo Obrigado!

A CAPES, CNPq e FAPEMIG, sem o apoio destas instituições o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

A meus amigos, aqueles que permaneceram a meu lado nos momentos difíceis, e apesar de tantos problemas, continuaram a acreditar que eu conseguiria. Para aqueles que estão longe, nunca esquecerei dos telefonemas de força, cartas, emails; para os que estão perto, obrigada por perdoar minhas falhas e minhas ausências nas nossas datas.

A você que me ensinou a ver a vida desta forma: “estamos nesta vida para sermos felizes”, todo dia é dia de recomeçar, pedir perdão, sorrir, chorar, amar e fazer diferente; a pesquisa precisa exatamente disso: pessoas que façam a diferença.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização neste trabalho, meu muitíssimo obrigada!

## SÚMARIO

Índice de figuras .....	xiii
Índice de tabelas .....	xiv
1. Introdução.....	16
2. Objetivos.....	19
2.2 – Objetivos.....	19
2.2.1 – Objetivo geral .....	19
2.2.2 – Objetivos específicos.....	19
3. Aspectos teóricos.....	21
3.1. LEITE .....	21
3.1.1 - Composição Média do Leite .....	21
3.1.2 – Microorganismos contaminantes .....	22
3.2 – LEGISLAÇÃO .....	24
3.2.1 Instrução Normativa 51, de 18/09/2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) .....	24
3.2.2 Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA) .....	25
3.3. RESFRIGERAÇÃO DO LEITE .....	25
3.4. MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS .....	28
3.4. 1 - Principais tipos de microrganismos psicrotróficos .....	29
3.4.2 - Crescimento de Microrganismo psicrotróficos .....	31
3.4.3 - Fontes de contaminação do leite por psicrotróficos.....	31
3.4.4 - Ocorrência de microrganismos psicrotróficos no leite.....	32
3.5 –PROTEÓLISE E LIPÓLISE NO LEITE E DERIVADOS.....	33
3.5.1 Proteólise .....	34
3.5.2 Lipólise .....	38
3.6 – HIGIENE NA PRODUÇÃO DO LEITE .....	38
4. Estado da arte.....	42
5. Metodologia Experimental .....	47
5.1. Coleta das Amostras: .....	47
5.2. Contagem, Isolamento e identificação de bactérias psicrotróficas.....	47
5.3. Testes de caracterização dos microrganismos .....	50
5.3.1 Reação de KOH 3% (segundo QUIN et al., 1999).....	50
5.3.2 Coloração de Gram.....	50

5.3.3 Motilidade no meio SIM e teste de produção de Indol.....	51
5.3.4 Teste de Catalase .....	51
5.3.5 Teste de OF.....	52
5.3.6 Produção de Amônia a partir da Arginina.....	53
5.3.7 Crescimento em meio Mac Conkey (MC).....	53
5.3.8 Teste de Oxidase.....	54
5.3.9 Teste de TSI.....	54
5.3.10 Teste de Vermelho de metila (VM).....	55
5.3.11 Teste de Vogues-Proskauer (VP) .....	55
5.3.12 Teste de Urease.....	56
5.3.13 Teste de Citrato.....	56
5.3.14 Lia (Ágar Lisina Ferro) .....	57
5.3.15 Formação de ácidos a partir de carboidratos .....	58
5.3.16 Hidrólise do hipurato de sódio .....	59
5.3.17 Tipo de hemólise .....	60
5.3.18 Teste de resistência a lisostafina.....	60
5.3.19 Coloração de Esporos .....	61
5.3.20 Utilização dos Kits API .....	62
5.4. Caracterização das bactérias isoladas quanto à produção de enzimas hidrolíticas .....	64
5.4.1 Verificação da atividade proteolítica e lipolítica.....	64
5.6 Análise estatística .....	64
6. Resultados e Discussões .....	66
6.1 Contagem de bactérias psicotróficas (UFC/ml) – tanques individuais e comunitários .....	66
6.2. Identificação dos isolados bacterianos obtidos de leite oriundo de tanques comunitários e individuais.....	68
6.3 - Isolados Gram negativas .....	69
6.3.1 Comparação entre Bactérias Gram negativas predominantes nos tanques comunitários e individuais.....	70
6.3.2 Análise das bactérias patogênicas encontradas .....	71
6.3.3 Atividade Enzimática .....	72
6.3.3.1 Crescimento da colônia e atividade proteolítica.....	74

6.3.3.2 Crescimento e Atividade Lipolítica.....	77
6.4 1 Atividade enzimática .....	81
7. Conclusões e Sugestões .....	86
7.1 – Conclusões.....	86
7.2 – Sugestões .....	87
8. Referências Bibliográficas.....	89
ANEXOS.....	91

## Índice de figuras

Figura 3.1: Efeito do pH na atividade da protease MC 60	36
Figura 3.2: Efeito da temperatura na atividade da protease MC 60	36
Figura 5.1 – Esquema da coleta, isolamento e identificação das culturas do leite refrigerado	50
Figura 5.2.- Foto - reação de KOH 3%	51
Figura 5.3 - Foto - teste de catalase	53
Figura 5.4 - Foto – reação de oxidase	55
Figura 6.1 - Distribuição em percentagem da contagem de microrganismos psicrotróficos (UFC/mL) em leite cru refrigerado em tanques individuais e comunitários	68
Figura 6.2 - Distribuição de bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado, segundo coloração de Gram	69
Figura 6.3. Atividade proteolítica e lipolítica evidenciada pela presença de halo em torno da colônia	73
Figura 6.4. Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto à atividade proteolítica das estirpes Gram-negativas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C	76
Figura 6.5 – Crescimento (A) e proteólise (B) da <i>Pseudomonas fluorescens</i> P88 nas temperaturas de 4, 7, 10 e 21°C.	78
Figura 6.6. Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto a atividade lipolítica das estirpes Gram negativas incubadas a 4, 7, 10 e 21°C	79
Figura 6.7 – Crescimento (A) e lipólise (B) da <i>pseudomonas fluorescens</i> P88 nas temperaturas de 4,7, 10 e 21°C	80
Figura 6.8. Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto à atividade proteolítica das estirpes Gram positivas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C	84
Figura 6.9. Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto à atividade lipolítica das estirpes Gram positivas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C	85

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Composição média do leite	22
Tabela 2 - Gêneros de bactérias contendo espécies psicrotróficas	31
Tabela 5.1 – Controles positivos e negativos do teste bioquímico de formação de ácidos a partir de carboidratos	60
Tabela 6.1 – Identificação das estirpes Gram negativas isoladas nos tanques comunitários e individuais utilizando o sistema de identificação API	71
Tabela 6.2 - Avaliação das bactérias Gram negativas quanto a sua atividade enzimática nos tanques individuais, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C	74
Tabela 6.3 - Avaliação das bactérias Gram negativas quanto a sua atividade enzimática nos tanques comunitários, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C	75
Tabela 6.4 - Atividade proteolítica da <i>Pseudomonas fluorescens</i> em diferentes temperaturas.	77
Tabela 6.5 - Atividade lipolítica da <i>Pseudomonas fluorescens</i> em diferentes temperaturas	80
Tabela 6.6 – Identificação das estirpes Gram positivas isoladas nos tanques individuais e comunitários utilizando o sistema de identificação API e testes bioquímicos.	81
Tabela. 6.7 - Avaliação das bactérias Gram positivas quanto a sua atividade enzimática nos tanques individuais, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C	82
Tabela 6.8 - Avaliação das bactérias Gram positivas quanto a sua atividade enzimática nos tanques comunitários, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C	83

---

---

## **Capítulo 1: Introdução Geral**

---



## 1. Introdução

O leite apresenta um importante papel na alimentação humana por ser considerado um dos alimentos mais completos e, pelo mesmo motivo, também é um meio de cultura rico para muitos microorganismos encontrados na natureza.

A qualidade microbiológica do leite cru tem um impacto significativo na qualidade final do produto (ZADOW, 1980). As recentes mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte vêm predispondo a ocorrência de alterações na microbiota predominante no leite. Embora diminua o desenvolvimento de microorganismos mesófilos, reduzindo a acidificação precoce do leite cru, o resfriamento do leite na fazenda, logo após a ordenha, e a posterior coleta e transporte em caminhões tanque isotérmicos atuam de forma seletiva facilitando à proliferação de microorganismos psicotróficos.

O termo “**microrganismos psicotróficos**” foi introduzido em 1960 e melhor definido em 1976 pela Federação Internacional de Laticínios/IDF, 1995 (FIL) como microorganismos que tem capacidade de crescer a 7 °C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento. A maioria dos psicotróficos apresenta temperatura ótima de crescimento entre 20 e 30 °C (MUIR, 1996).

Os tanques de refrigeração foram introduzidos no início de 1950 em países desenvolvidos, quando, então, o leite pôde ser resfriado rapidamente e estocado sob refrigeração na fazenda (FAIRBAIRN E LAW, 1986). No Brasil, a implantação destes tanques teve início somente a partir da década de 90 sendo regulamentada no ano de 2002 (PINTO et al, 2003). A Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece que o leite deve ser refrigerado a 4°C ou menos, até 3 horas após a ordenha e mantido a temperatura de conservação de 7°C na propriedade rural ou no tanque comunitário e podendo chegar a 10°C ao estabelecimento processador. A Instrução Normativa nº 51 do estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento que vai beneficiá-lo deve ser no máximo de 48 horas, independente do seu tipo. Recomenda-se como ótimo, um período de tempo não superior a 24 horas (BRASIL, 2002). Estas temperaturas recomendadas para a refrigeração e armazenamento do leite na fonte de produção permitem o crescimento de bactérias psicotróficas e a atividade de suas enzimas.

Os psicotróficos mais comumente isolados de leite cru são bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Arthobacter*, e algumas são Gram-positivas pertencentes aos gêneros *Bacillus*,

*Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus* (COUSIN, 1979; ARCURI, 2003).

O número e também os tipos de microrganismos presentes no leite cru é de extrema importância na qualidade final de produtos lácteos (MUIR, 1996; ADAMS et al., 1975; PINTO et al., 2003). Mesmo quando presentes em pequeno número, às bactérias psicrotróficas podem causar degradação dos componentes do leite, decorrentes desta multiplicação. Embora a maioria dos psicrotróficos seja destruída pela pasteurização, suas enzimas proteolíticas e lipolíticas são termorresistentes e podem provocar alterações físicas e organolépticas no leite e seus derivados, após o tratamento térmico (ADAMS et al., 1975; STADHOUDERS, 1975; WASHAM et al., 1977; COUSIN, 1982; BRAMLEY & MCKINNON, 1990; APHA, 1992; DOMMETT, 1992; MUIR, 1996; ANDRADE et al., 1998; SANTANA et al., 2001; PINTO et al., 2003). Por esse motivo estes microrganismos ganharam especial importância em vários países e atualmente no Brasil, com a introdução do resfriamento do leite nas propriedades e a granelização do leite.

No Brasil, alguns estudos evidenciaram valores altos nas contagens de psicrotróficos, na ordem de  $10^5$ - $10^8$  UFC/mL em leite cru refrigerado (SOUZA et al., 1999; MENDONÇA et al., 2001; BRITO et al., 2002; BRUM et al., 2004), mas pouco se conhece a composição da microbiota predominante, nem as propriedades hidrolíticas dessas bactérias.

---

## **Capítulo 2: Objetivos**

---

## **2. Objetivos**

### **2.2 – Objetivos**

#### **2.2.1 – Objetivo geral**

- Isolamento, identificação e determinação da atividade proteolítica e lipolítica de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado.

#### **2.2.2 – Objetivos específicos**

- Isolar e identificar bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru armazenado sob refrigeração em tanques individuais e comunitários de propriedades rurais situadas na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e Sudeste do Rio de Janeiro;
- Avaliar o potencial de deterioração das bactérias psicrotróficas isoladas pela verificação de sua capacidade proteolítica e lipolítica;
- Comparar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado em tanques individuais e comunitários.

---

## **Capítulo 3: Aspectos Teóricos e Revisão Bibliográfica**

---

### **3. Aspectos teóricos**

Neste capítulo são discutidos os aspectos teóricos deste trabalho, de forma a facilitar a compreensão dos conceitos envolvidos.

#### **3.1. LEITE**

O leite tem sido considerado como o alimento humano "mais próximo da perfeição". Seu excepcional valor nutritivo é devido aos seus principais constituintes: proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas e água, no entanto, é também, um excelente meio nutritivo para o crescimento de muitas bactérias. O lei

te contém microrganismos já no momento em que é tirado da vaca, e fica exposto a contaminação durante e após a ordenha, os microrganismos presentes no leite são capazes de se multiplicarem e causarem alterações químicas, tais como a degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos, o que pode torná-lo inaceitável para o consumo (BHEMER, 1981).

##### **3.1.1 - Composição Média do Leite**

Na tabela 1 é apresentada a composição média do leite.

Tabela 1 – Composição média do leite

Água	87,5 %
Matéria gorda	3,5 %
Caseína	3,0 %
Albumina	0,6 %
Lactose (açúcar)	4,6 %
Sais minerais (cinzas)	0,7 %

Fonte: BHEMER (1981)

A água em volume é o componente presente em maior quantidade do leite como mostra a tabela 1.

A matéria gorda é o elemento mais variável do leite; seu teor varia de 1,5 a 7,0%, sendo a média para o leite de diversas procedências igual a 3,5 %. Esta tem peso específico de 0,93 a 15°C, funde-se a 33°C e solidifica-se entre 20 e 25°C, sendo formada dos seguintes ácidos: butírico, capríco, caprílico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico e oxiesteárico (BHEMER, 1981).

Encontra-se no leite as seguintes caseínas:  $\alpha_{s1}$  caseína,  $\alpha_{s2}$  caseína,  $\beta$  caseína,  $\gamma$  caseína e  $\kappa$  caseína. As caseínas formam uma solução coloidal, constituindo a maior parte da matéria azotada do leite. A caseína é o principal componente dos queijos e das coalhadas.

A densidade da caseína é de 1,486 à 15°C e, em média, encontrada na proporção de 3%. Sua obtenção é feita por precipitação natural (fermentação) ou com o auxílio de coalhos e ácidos (BHEMER, 1981).

A albumina, também chamada de lacto-albumina, é inteiramente solúvel na água, não se coagula pelo coalho, mas sim por ácidos e pelo calor (BHEMER, 1981).

A lactose, ou açúcar do leite, pertence ao grupo dos sacarídeos, sendo encontrada no leite de todos os mamíferos; no leite de vaca sua porcentagem é de 4,6% (BHEMER, 1981).

A transformação da lactose em ácido láctico causa a precipitação da caseína e, portanto, a coagulação do leite (BHEMER, 1981).

Os sais entram em pequena quantidade, aproximadamente 0,7% da composição do leite (BHEMER, 1981).

### 3.1.2 – Microorganismos contaminantes

Os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura. Essa microbiota inclui desde microrganismos psicotróficos até microrganismos termófilos. Mesófilos é um grupo muito importante, inclui coliformes e bactérias lácteas, que podem atingir número elevado quando o leite é mantido a temperatura ambiente e causar a sua deterioração por acidificação. A maioria dos Psicotróficos são termolábeis, porém algumas destas bactérias produzem proteases e lípases que são termorresistentes. As bactérias Termodúricas são aquelas resistentes à pasteurização, porém não crescem à temperatura de pasteurização. São na maioria mesófilos, e algumas podem ser também incluídas no grupo psicotrófico (ORDÓÑEZ et al, 2005).

O leite cru geralmente contém baixo número de bactérias termófilas, tais microrganismos não habitam o úbere de vaca, contaminando o leite através de fontes diversas, como: exterior das tetas; se estiverem sujas de terra, de esterco, de material de cama, etc (ORDÓÑEZ et al, 2005).

A presença destes grupos de microrganismos, no leite cru reflete as condições higiênicas na produção.

Outros microrganismos, como os patogênicos, são importantes no que se refere à qualidade do leite. As bactérias que causam doenças no animal leiteiro, como *Salmonella spp.*, *Brucella abortis*, *Mycobacterium tuberculosis*, podem contaminar o homem, principalmente

pelo consumo de leite cru. Muitas bactérias patogênicas, podem estar presentes no leite cru, em consequência de doença do úbere. Dentre os microrganismos causadores de mastite destacam-se *Streptococcus uberis*, *Strep. agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O *S. aureus* é um dos principais responsáveis por toxinfecção alimentares, visto produzir toxina estável ao calor. Além do próprio animal, os patógenos podem ter outras origens, tais como o homem, os utensílios e a água. Patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica* são psicotróficas (ORDÓÑEZ et al, 2005).

No Brasil, o leite *in natura* apresenta, de maneira geral altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos e coliformes, indicando assim uma deficiência na higiene de produção (MOURA *et al*, 1999).

A refrigeração do leite na propriedade é uma exigência da IN 051 e está cada vez mais sendo utilizada. Quando o leite é armazenado sob temperaturas de aproximadamente 4°C, ocorre o controle do crescimento de microrganismos mesófilos (temperaturas ótimas de crescimento em torno de 35°C). Esses microrganismos têm a capacidade de multiplicarem no leite, acidificando o produto pelo consumo da lactose e produção de ácido láctico. Mas apenas o resfriamento não irá garantir a qualidade do produto, pois, dará oportunidade de crescimento para outro grupo de microrganismos chamados de psicotróficos que têm capacidade de multiplicação em baixas temperaturas, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento. A maioria dos psicotróficos apresentam temperatura ótima de crescimento na faixa mesofílica, de 20 a 30°C (MUIR, 1996).

Assim, um microrganismo pode ser mesófilo e psicotrófico. Sabe-se que a frequência de psicotróficos está relacionada diretamente com as boas práticas de produção. Pesquisas mostram que no leite produzido sob condições adequadas de higiene, menos de 10% dos microrganismos da microbiota total pertencem ao grupo dos psicotróficos; já em condições inadequadas, esta contagem pode atingir 75% ou mais da microbiota total (ORDÓÑEZ et al, 2005).

Os microrganismos psicotróficos encontrados no leite são na maioria Gram negativos. O gênero Gram negativo mais freqüente em leite cru e no pasteurizado é *Pseudomonas ssp*, por apresentar melhor capacidade de crescimento que outras bactérias Gram negativas. Outros gêneros como *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aerobacter*, *Bacillus* e *Alcaligenes* e o grupo coliformes também são citados como importantes psicotróficos no leite, esse grupo de microrganismos é proveniente do meio ambiente (solo, água, vegetação, fezes) e de equipamentos de ordenha.



Um outro grupo de microrganismos denominados psicotróficos termodúricos, que além de se multiplicarem sob refrigeração, sobrevivem à pasteurização. O gênero mais freqüente dentro deste grupo é o *Bacillus*, e sua origem está relacionada à água, tetas/úberes, solo e equipamentos mal higienizados. Não só suas enzimas, mas o próprio microrganismo continua viável por toda a cadeia produtiva desde a sua ordenha até o produto final.

### 3.2 – LEGISLAÇÃO

#### 3.2.1 Instrução Normativa 51, de 18/09/2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

A Instrução Normativa 51 (IN 51) de 18/09/2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que trata dos regulamentos técnicos para a produção, identidade e qualidade do leite, estabelece novas exigências para o leite cru. Entre elas incluem-se as determinações do teor de gordura, proteína, contagem de células somáticas, contagem total de bactérias e a detecção de resíduos de antibióticos. Além destes requerimentos relacionados à qualidade higiênica e de composição da matéria-prima, também estão sendo exigidas a refrigeração do leite e a coleta em caminhões com tanques isotérmicos (coleta a granel) (BRASIL, 2002).

A partir de 2008 o limite estabelecido na Instrução Normativa 51 para a contagem bacteriana será reduzido, passando a um máximo de 750.000 ufc/ml. A possibilidade de não atingir esse limite poderá contribuir para a exclusão de pequenos produtores ou para o recebimento de um preço inferior pelo leite, quando as empresas implementarem programas de pagamento por qualidade.

Procedimentos para obtenção de leite com qualidade higiênica adequada são conhecidos (BRITO e BRITO, 2001), mas são direcionados principalmente para produtores individuais, que geralmente refrigeram o leite imediatamente após a ordenha. Entretanto, o impacto da falta de investimento para atender essas condições na fazenda, é maior para o pequeno e médio produtores. Estes precisam buscar no âmbito coletivo, formas para se adequar às limitações dos sistemas, que não têm produção suficiente que viabilize um tanque de resfriamento na fazenda. Devido ao fato de ser uma realidade emergente e em rápida transformação, não se dispõe de conhecimento quanto ao impacto econômico deste sistema no perfil da produção, num futuro próximo.

### 3.2.2 Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA)

O Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA) compreende o conjunto de instituições da Administração Pública direta e indireta da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, que exerçam atividades de regulação, normalização, controle e fiscalização na área de defesa agropecuária. O SUASA opera em conformidade com os princípios e definições especificados pela legislação relativa a sanidade agropecuária, incluindo o controle de atividades de saúde, sanidade, inspeção, fiscalização, vigilância de animais, plantas, insumos, inclusive alimentos para animais, produtos de origem animal e vegetal. Neste Regulamento (Lei 9.712 de 31 de março de 2006) ficaram estabelecidas as regras gerais de qualidade e sanidade dos produtos agropecuários, as responsabilidades e os processos de controle. No segundo artigo deste regulamento contêm os princípios a serem observados em matéria de sanidade agropecuária, especialmente os relacionados com as responsabilidades dos produtores, fabricantes e das autoridades competentes, com requisitos estruturais, operacionais de sanidade agropecuária, com processos para a aprovação de estabelecimentos, e com os requisitos de armazenagem e transporte, rotulagem e identificação. Neste documento está claro que todos os integrantes da cadeia produtiva, **produtores rurais**, industriais e fornecedores de insumos, distribuidores, cooperativas e associações, industriais e agroindustriais, atacadistas e varejistas, importadores e exportadores, empresários e quaisquer outros operadores do agronegócio ao longo da cadeia de produção são os principais responsáveis pela garantia de que a sanidade agropecuária e a qualidade dos produtos de origem animal e vegetal, bem como dos insumos agropecuários, não sejam comprometidas.

### 3.3. RESFRIGERAÇÃO DO LEITE

No Brasil, uma parte significativa do leite *in natura* apresenta baixa qualidade microbiológica. A qualidade do leite está associada com as práticas de manejo e higiene nas fazendas, a temperatura em que é mantido durante o resfriamento e transporte e o tempo gasto no transporte entre a fazenda e a indústria. Os vários fatores citados podem contribuir para a introdução e o desenvolvimento de microrganismos no leite (SILVEIRA, 1997). Segundo MUTUKUMIRA *et al* (1996) a qualidade do leite está associada, com a carga microbiana presente.

A presença de bactérias capazes de se multiplicar sob condições de refrigeração, no leite cru, foi reportada há quase um século (MORITA, 1975). Sua importância, no entanto, tornou-se aparente apenas há cinquenta anos, com a adoção dos tanques refrigeradores de

leite, capazes de resfriar rapidamente o leite cru após a ordenha e estocá-lo até o momento da coleta (THOMAS & THOMAS, 1973a ; FAIRBAIRN & LAW, 1986). No Brasil, o início de sua implementação ocorreu na segunda metade da década de 90, sendo regulamentada em 2002 por meio da Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002).

Nos programas sanitários para leite de consumo, um dos fatores fundamentais para melhorar a sua qualidade é o resfriamento na própria fazenda (COUSIN, 1982; COLLINS, 1991). No entanto, o armazenamento do leite por longos períodos em temperaturas de refrigeração tem resultado em novos problemas de qualidade para a indústria de laticínios. A refrigeração atua seletivamente favorecendo a proliferação dos microrganismos psicotróficos que se desenvolvem em baixas temperaturas (PHILLIPS, 1959; FAIRBAIRN & LAW, 1986; ROBINSON, 1987; SILVEIRA, 1997).

Com a estocagem do leite a 5°C, nas propriedades, a população de microrganismos psicotróficos é duplicada em cerca de 8 horas, em uma progressão geométrica de razão igual a nove para cada 24 horas de armazenamento (SANTOS & BERGMAN, 2003). Em leites de tanques comunitários armazenados em temperaturas acima de 7°C esse aumento é ainda mais evidente (THOMAS, 1974).

Analisando a influência da temperatura durante o transporte sobre a qualidade microbiológica do leite cru, SANTOS & BERGMANN (2003) obtiveram contagem de psicotróficos quatro vezes superior em leites transportados das fazendas às usinas de beneficiamento em temperatura ambiente quando comparados com as amostras transportadas sob refrigeração, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

O resfriamento do leite após a ordenha na fazenda e sua coleta e transporte em caminhões-tanque isotérmicos tem apresentando vantagens e desvantagens (PRATA, 2001; SANTOS & FONSECA, 2002).

As principais vantagens incluem a diminuição dos custos de transporte e uniformização do suprimento, além da redução da ocorrência de acidificação do leite cru, por inibir ou reduzir o desenvolvimento de microrganismos mesófilos fermentadores de lactose (BOOR *et al.*, 1998; PRATA, 2001). Embora promova uma queda na taxa de multiplicação bacteriana, inclusive dos microrganismos psicotróficos, a redução da temperatura de estocagem e transporte do leite é seletiva para as bactérias psicotróficas que, em períodos prolongados em temperaturas iguais ou menores que 7°C, passam de inexpressivos a dominantes, apresentando um considerável potencial deteriorativo, capaz de promover

mudanças organolépticas indesejáveis no leite (MORITA, 1975; KRAFT & REY, 1979; ALMEIDA & FILHO, 1993; PRATA, 2001; SANTOS & FONSECA, 2002).

Diversas reações bioquímicas podem ser detectadas em leites estocados em baixas temperaturas por longos períodos, em função da atuação dos microrganismos psicotróficos sobre alguns componentes do leite. Entre elas, pode-se citar: reações de fermentação de carboidratos, como a lactose, com a liberação de ácidos e gases, decomposição da uréia, produção de pigmentos de diversas cores no leite, além da hidrólise de proteínas e lipídios (COUSIN, 1982).

A população de microrganismos psicotróficos necessária para causar mudanças indesejáveis no leite varia de acordo com os diferentes gêneros e espécies (THOMAS & THOMAS, 1973a). Segundo ALMEIDA & FILHO (1993), as mudanças bioquímicas resultantes do crescimento de bactérias psicotróficas no leite passam a ser significativas quando as contagens superam  $10^6$  UFC/mL. Amostras de leite cru com populações iniciais de  $10^4$  UFC/mL podem exceder  $10^6$  UFC/mL quando armazenadas a 7°C por 2 dias ou a 5 °C por 3 dias (LAW et al., 1979). Apenas um ou dois suprimentos de leite cru excessivamente contaminados, com uma microbiota predominantemente psicotrófica, são suficientes para comprometer a qualidade de um caminhão-tanque inteiro (THOMAS & THOMAS, 1973a).

Cepas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi* incubadas em leite desnatado a 7°C apresentaram atividade proteolítica 20h após a incubação (KOHLMANN et al., 1991). Mudanças organolépticas já foram observadas em leites estocados na faixa de 6 a 20°C (COUSIN, 1982).

Na maioria das fazendas leiteiras a coleta do leite é feita em dias alternados. Com a diminuição gradativa do número de fazendas leiteiras e usinas de beneficiamento, o leite coletado ainda é transportado por longas distâncias antes de chegar às usinas de beneficiamento e pode ficar armazenado por 3 a 4 dias antes de ser processado (COUSIN, 1982). Essa estocagem por períodos extensos em temperatura de refrigeração, por sua vez, acaba favorecendo o desenvolvimento da microbiota psicotrófica (THOMAS & THOMAS, 1973b; COUSIN, 1982; ALMEIDA & FILHO, 1993; SILVEIRA et al., 1998).

Vários fatores devem ser considerados antes de se estabelecer o período máximo de estocagem do leite em tanques de refrigeração, como a sua temperatura de refrigeração, o número, atividade e o tipo de microrganismos psicotróficos inicialmente presentes no leite (THOMAS & THOMAS, 1973b; FAIRBAIRN & LAW, 1986; ALMEIDA & FILHO, 1993). Considerando esses fatores, o leite obtido em boas condições de higiene pode ser estocado a 10°C por apenas um dia, enquanto que, períodos de estocagem de 2 a 3 dias requerem

temperaturas de no máximo 4°C para a manutenção de sua qualidade sem alterar as suas propriedades organolépticas (THOMAS & THOMAS, 1973b; FAIRBAIRN & LAW, 1986).

A IN 51 (BRASIL, 2002) exige que o leite deve ser refrigerado até temperatura igual ou inferior a 4°C, em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, ou temperatura igual ou inferior a 7°C, nos casos de tanque de refrigeração por imersão, em tempo máximo de três horas após o término da ordenha, independente de sua capacidade.

Alguns aspectos práticos, no entanto, limitam os benefícios obtidos com o resfriamento do leite na fazenda e seu transporte a granel. Entre eles pode-se citar a má qualidade de energia elétrica disponível em grande parte das propriedades rurais brasileiras e a qualidade de várias marcas de tanques refrigeradores comercializados no Brasil, determinando o que se convencionou denominar de “resfriamento marginal do leite”, ou seja, o resfriamento e armazenamento do leite a temperaturas que variam entre 5 e 10°C (SANTOS e FONSECA, 2002).

Mesmo armazenado em tanques refrigeradores a 4°C, o leite ainda oferece condições para o desenvolvimento de microrganismos psicrófilos presentes, principalmente de bastonetes Gram-negativos. Quando se trabalha com uma matéria-prima de elevada contagem bacteriana inicial, realidade observada no Brasil, essa condição se agrava ainda mais, requerendo o emprego de temperaturas inferiores às empregadas em leites com baixas contagens microbianas iniciais. (THOMAS & THOMAS, 1973b, ORDÓÑEZ, 2005).

Analisando tais limitações, AMARO (2002) observou que esse problema tem levado à demanda crescente por padrões nacionais que regulem terminologias, dimensionamentos e testes capazes de checar o desempenho dos tanques refrigeradores. Algo semelhante tem sido proposto pelo Conselho Nacional de Qualidade do Leite Brasileiro visando estabelecer, no Brasil, padrões já existentes em outros países.

### 3.4. MICRORGANISMOS PSICRÓFICOS

Várias denominações são utilizadas para os microrganismos capazes de se desenvolverem em baixas temperaturas. Os termos mais utilizados para estes microrganismos são: psicrófilo, psicrófilo e criófilo (COUSIN, 1982).

O termo psicrófilo é derivado do grego *psychro*, que significa frio, e *philos*, que significa gostar, afinidade. Por isso, o termo psicrófilo implica em microrganismos que crescem em baixas temperaturas (COUSIN, 1982). Muitos pesquisadores, no entanto, têm contestado o uso deste termo, pois ele implica na preferência pelo crescimento em baixas

temperaturas quando, na verdade, estes microorganismos crescem melhor a 20°C ou mais (THOMAS & DRUCE, 1969, citado por COUSIN, 1982).

Existe um consenso de que certos microorganismos podem coexistir em dois grupos térmicos adjacentes. Para aqueles microorganismos mesofílicos que possuem a capacidade de se desenvolver ao redor de 0°C, os termos psicro-tolerante e psicrotrófico são provavelmente os melhores a serem usados, sendo o último mais frequentemente usado na literatura (MORITA, 1975).

A maior parte da literatura publicada antes de 1960 referia-se mais a psicrófilos que psicrotróficos (COUSIN, 1982). Em 1960, recomendou-se o uso do termo psicrotrófico para microorganismos capazes de se multiplicarem a 7°C ou menos, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (THOMAS & THOMAS, 1973a; MORITA, 1975; KRAFT & REY, 1979; COUSIN, 1982; PRATA, 2001).

#### 3.4. 1 - Principais tipos de microorganismos psicrotróficos

As bactérias psicrotróficas encontradas no leite e nos produtos lácteos não constituem um grupo taxonômico específico. As cepas descritas inclui bactérias Gram negativas e Gram positivas, pertencentes a uma diversidade de gêneros, como mostra a Tabela 2. Em países de clima temperado a maioria destas bactérias são bastonetes Gram negativos, não esporulados, oxidase positivo, geralmente pertencente ao gênero *Pseudomonas* (COUSIN, 1982; BRAMLEY & McKINNON, 1990; DOMMETT, 1992; APHA, 1992; JASPE et al., 1993; MUIR, 1996; SORHAUNG & STEPANIAK, 1997; ARCURI, 2003; ORDOÑEZ et al,2005).

Outros gêneros como *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aerobacter*, *Bacillus* e *Alcaligenes* e o grupo coliformes também são citados como importantes psicrotróficos no leite, esse grupo de microorganismos é proveniente do meio ambiente (solo, água, vegetação, fezes) e de equipamentos de ordenha (COUSIN, 1982).

Ainda existe um grupo de microorganismos denominados psicrotróficos termodúricos, que além de se multiplicarem refrigeração, sobrevivem a pasteurização. Espécies mais frequentes deste grupo pertencem ao gênero *Bacillus*, sua origem está relacionada à água, tetas/úberes, solo e equipamentos mal higienizados. Não só suas enzimas, mas o próprio microorganismo continua viável por toda a cadeia produtiva desde a sua ordenha até o produto final.

**Tabela 2. Gêneros de bactérias contendo espécies psicotróficas.**

<b>Gram positivas</b>	<b>Gram negativas</b>
<i>Arhrobacter</i>	<i>Achromobacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Listeria</i>	<i>Campilobacter</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Chromobacterium</i>
<i>Corybacterium</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Sthaphylococcus</i>	<i>Hafnia</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Janthinobacterium</i>
	<i>Klebsiella</i>
	<i>Moraxella</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Serratia</i>
	<i>Xanthomonas</i>
	<i>Yersinia</i>

FONTE: Adaptado de Cox (1993), citado por Arcuri (2003).

As *Pseudomonas* spp. são consideradas as bactérias psicotróficas que possuem uma melhor capacidade de crescimento em ambiente refrigerado, apresentando um tempo médio de vida menor que amostras de leite com outros tipos de microrganismos, quando estocados a temperaturas entre 4 a 7°C (SMITHWELL e KAILASAPATHY, 1995). CRAVEN e MACAULEY (1992), GARG (1990) e BRAMLEY e McKINNON (1990) observaram em seus trabalhos com leite refrigerado a presença de *Pseudomonas fluorescens*, sendo esta a espécie que mais produziu lipases e proteases.

Bactérias de importância em saúde pública, como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. e estirpes hemorrágicas de *Escherichia coli* envolvidas em casos de doenças ocasionadas pelo consumo de leite têm sido encontradas, em pequena porcentagem, em tanques refrigeradores de leite (JAYARAO & WANG, 1999). Algumas estirpes de *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

enteropatogênica e *Clostridium perfringens* já foram isoladas em diversos casos de intoxicação alimentar envolvendo o consumo de leite e derivados lácteos, porém, de real importância para o consumo de produtos refrigerados, destacam-se apenas as espécies *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*, capazes de se desenvolver em baixas temperaturas (COUSIN, 1982).

#### 3.4.2 - Crescimento de Microrganismo psicotróficos

O crescimento de bactérias psicotróficas à temperatura de refrigeração é caracterizado por uma fase de adaptação ou latência, chamada *fase lag*, em que a taxa de crescimento é insignificante. A duração desta fase varia muito em função da temperatura em que o leite é mantido, ela é mais longa em temperaturas mais baixas (FOSTER, 1965; GEHIGER, 1980). Após esta fase há uma fase logarítmica também longa e lenta (ARCURI, 2003).

O gênero *Pseudomonas* inclui as espécies com menor tempo de geração em intervalos de temperatura de 0 °C a 7 °C. *Pseudomonas spp.* isoladas de leite cru que demonstraram crescimento mais rápido no leite, apresentaram tempo de geração entre 8 e 12 horas a 3 °C e entre 5,5 e 10,5 horas, em temperaturas entre 3 a 5 °C, o que é suficiente para causar deterioração em leite que contém inicialmente apenas uma UFC/mL, dentro de cinco dias (ARCURI, 2003).

#### 3.4.3 - Fontes de contaminação do leite por psicotróficos

As bactérias psicotróficas são ubíquas, ou seja, estão presentes no meio ambiente, podendo estar nos mais diversos lugares, independente do clima ou estação do ano (THOMAS, 1966; DRUCE & THOMAS, 1970; COUSIN, 1982). Já foram encontradas em águas doces e salgadas, águas paradas e correntes, cloradas ou não, na superfície e interior de diversos peixes, nos solos, plantas, gramas, fenos, cevadas, aveias, vegetações, hortaliças, resíduos, lixos, esterco, dejetos, animais, carnes, leites, sorvetes, farinhas, ar e poeira (THOMAS & THOMAS, 1973a; COUSIN, 1982; JAYARAO & WANG, 1999; SANTOS e FONSECA, 2002).

As principais fontes de contaminação do leite incluem água, solo e vegetação (THOMAS, 1966; DRUCE & THOMAS, 1970; COUSIN, 1982). No ar encontram-se apenas pequeno número destas bactérias (THOMAS et al., 1958, 1966).

Outra fonte importante de psicotróficos é a presença de resíduos do leite em utensílios e equipamentos deficientemente limpos (THOMAS & THOMAS, 1976, 1977; PALMER,



1981; VON BOCKELMANN, 1981). As bactérias ali presentes podem começar a se multiplicarem tão logo entrem em contato com o leite e outros produtos e a população de psicotróficos pode atingir até 75% da microbiota total. A limpeza e sanificação desses equipamentos e utensílios reduzem este tipo de contaminação (COUSIN, 1982).

FORSTER (1982) demonstrou em seus estudos que os microrganismos estão largamente distribuídos na natureza tanto no verão quanto no inverno, podendo ser encontrados em água fresca, carne, feno e águas contaminadas (COUSIN, 1982). O feno, silagem e outros alimentos podem apresentar contagens tão altas quanto  $10^8$  UFC/g (INGRAHAM et al., 1959, citado por ARCURI, 2003).

#### 3.4.4 - Ocorrência de microrganismos psicotróficos no leite

O tipo e frequência de microrganismos do leite cru são determinados pela eficiência nas condições de higiene de produção, tempo e temperatura de estocagem e armazenamento (COUSIN, 1982; BRAMLEY & McKINNON, 1990). Portanto, o leite produzido sob condições adequadas de higiene e refrigerado a temperaturas iguais ou inferiores a 4 °C, apresenta baixa contagem de psicotróficos (COUSIN, 1982). THOMAS & THOMAS (1973), relatam que, em leite produzido sob condições sanitárias adequadas, menos de 10% da microbiota total pertencia ao grupo dos psicotróficos, ao passo que em condições higiênicas sanitárias desfavoráveis, a percentagem de psicotróficos no leite foi superior a 75%. MAHARI & GAHTE (1990), encontraram em Addis Abeba (Etiópia), a frequência de 98,1% de microrganismos psicotróficos em leite cru e 53% em leite pasteurizado.

PRABHA & SHANKAR (1994) estudaram a frequência de psicotróficos em leite e no ambiente de ordenha e observaram que 81,62% dos microrganismos de leite cru eram psicotróficos.

O predomínio de microrganismos psicotróficos no leite cru proveniente de tanques de refrigeração, nem sempre é observado. Em experimento visando uma rápida estimativa de psicotróficos proteolíticos no leite POFFÉ & MERTENS (1988) observaram que apenas 30,4% dos microrganismos identificados eram psicotróficos. Em análise de amostras de leite de tanques comunitários de produtores individuais, observou-se que nas placas cerca de 35% de microrganismos eram psicotróficos. Tal fato pode estar relacionado com as condições higiênicas de ordenha, manipulação, problemas na refrigeração, equipamentos de ordenha e até mesmo nos caminhões-tanque que transportam o leite (RANDOLPH et al., 1973).

DESMASURES e GUEGUEN (1997) durante dois anos realizaram um monitoramento mensal da qualidade microbiológica do leite cru, obtido em boas condições

higiênicas e armazenado em tanques de refrigeração de fazendas especializadas. Dentre as bactérias isoladas, o gênero mais comumente encontrado foi *Pseudomonas*, mas sua concentração variou muito nas amostras nas quais esteve presente. Alguns microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram ocasionalmente detectados. *Listeria monocytogenes* foi detectada em apenas uma fazenda e a espécie *Yersinia enterocolitica* não foi isolada.

### 3.5 –PROTEÓLISE E LIPÓLISE NO LEITE E DERIVADOS

As bactérias psicotróficas constituem o grupo que mais afeta a qualidade do leite e derivados. Elas causam alterações ao se multiplicarem no leite cru ou após o tratamento térmico, pela atividade de suas enzimas extracelulares resistentes ao calor, pela multiplicação das que são termodúricas e pela contaminação pós-pasteurização (ARCURI, 2003).

Muitas bactérias psicotróficas são capazes de produzir enzimas extracelulares, sendo as proteases e as lipases as mais importantes em relação à deterioração de leite e produtos lácteos, e em menor importância as fosfolipases e outras enzimas metabólicas (LAW, 1976; ARCURI, 2003).

A qualidade microbiológica do leite cru tem um impacto significativo na qualidade final dos produtos. Problema que pode ocorrer como resultado de contaminação por microrganismos psicotróficos no leite cru é a gelatinização de produtos UAT derivados deste leite cru. A gelatinização é o resultado da ação de enzimas proteolíticas. Esta gelatinização pode ocorrer rapidamente, ou seja, após 4 semanas de processado, ou pode também levar mais que 12 meses, dependendo da temperatura de estocagem e das características particulares do leite (ZADOW, 1980).

Como as proteinases têm uma grande resistência ao calor, os únicos meios de controle são assegurar que o leite tenha uma baixa contagem de bactérias, particularmente das psicotróficas.

A produção das lipases, proteases e fosfolipases por bactérias psicotróficas geralmente apresenta seu valor máximo no final da fase exponencial ou na fase estacionária de multiplicação celular. A maioria das culturas lácteas atinge este estágio quando a população excede  $10^7$  células/mL (STEAD, 1987; MUIR, 1990). Por exemplo, *Pseudomonas* spp produz estas enzimas a temperatura de refrigeração na maioria das vezes no fim da fase exponencial de crescimento celular, segundo SORHAUNG & STEPANIAK (1997).

As bactérias psicotróficas são na maioria termolábeis, no entanto suas enzimas extracelulares não o são. O processo de pasteurização ou de UAT usado para o leite não é

suficiente para inativar as proteases e as lípases de origem bacteriana. A termorresistência dessas enzimas é muito maior que a dos esporos do *Bacillus stearotherophilus* (FAIRBAIRN & LAW, 1986; GOMES, 1988; ORDOÑEZ *et al.*, 2005).

A consequência da alta termoestabilidade das proteases e lipases elaboradas pelas bactérias psicrotróficas é que elas continuam agindo nos produtos elaborados, causando degradações do material protéico e lipídico principalmente nos produtos leite UAT, queijo e manteiga, que ficam armazenados por longos períodos. As proteases promovem quebra das proteínas, promovendo com isso uma queda de rendimento na produção de queijos pelo comprometimento da coagulação e alterações como sabor amargo (ORDOÑEZ *et al.*, 2005).

A velocidade das reações bioquímicas depende da temperatura de estocagem do leite. Os microrganismos psicrotróficos evidenciam atividades bioquímicas, porém mesmo em temperaturas próximas a 0°C (THOMAS & THOMAS, 1973b; COUSIN, 1982). As atividades proteolíticas e lipolíticas, no entanto, parecem ser aumentadas quando a temperatura de estocagem do leite é diminuída e inibidas em altas temperaturas (31 a 37°C) (KRAFT e REY, 1979; SILVEIRA *et al.*, 1998).

### 3.5.1 Proteólise

As proteases presentes no leite refrigerado podem ser naturais ou produzidas por psicrotróficos. A plasmina é a protease natural do leite mais comum (LÓPEZ-FANDIÑO, 1993).

Os microrganismos que melhor representam o grupo de psicrotróficos proteolíticos Gram negativo pertence ao gênero *Pseudomonas* por ser frequentemente isolado do leite, sendo a espécie mais comum *P. fluorescens* (LAW, 1979).

A maioria das *Pseudomonas* produz um tipo de protease que é uma metila-protease, um exemplo é a protease MC 60 produzida por *Pseudomonas* MC60, apresenta maior atividade entre pH 7 e 8, porém, apresenta atividade considerável entre pH 6 e 7, que é a faixa de pH normal do leite (Figura 3.1) (ADAMS *et al.*, 1975).

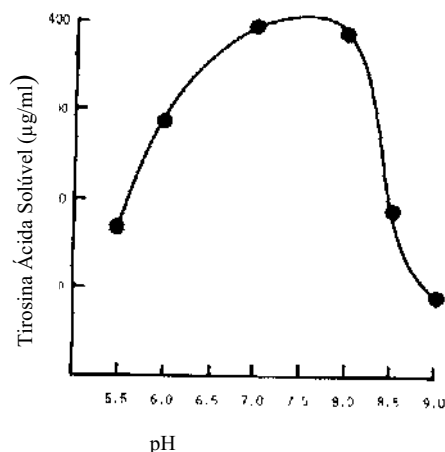


Figura 3.1: Efeito do pH na atividade da protease MC 60

Fonte: Adams et al. (1975)

A temperatura ótima de atividade da protease MC 60 é 45°C. A atividade sob temperatura ambiente (25°C) foi 25% daquela a 45°C. Acima de 45°C, a atividade foi reduzida e aos 55°C já não foi observada nenhuma atividade proteolítica (Figura 3.2) (Adams et al. 1975). As proteases de psicotróficos (a maioria *Pseudomonas* spp.) sobrevivem a tratamentos térmicos de pasteurização e UAT, apresentam atividade ótima a 30-45°C e são mais ativos a 4-7°C que as enzimas de microrganismos mesofílicos (SØRHOUG e STEPANIAK, 1997).

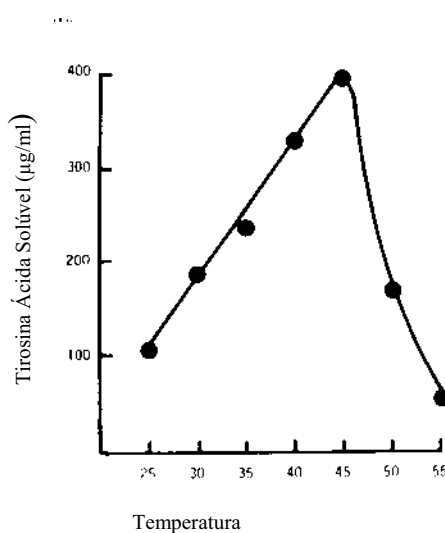


Figura 3.2: efeito da temperatura na atividade da protease MC 60

Fonte: Adams et al. (1975)

As proteases degradam preferencialmente a  $\kappa$ -caseína, seguindo-se a  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseína. As proteínas do soro,  $\alpha$  lactoalbumina e  $\beta$  lactoglobulina são geralmente menos susceptíveis a sua ação (LAW, 1979; COUSIN, 1982; ARCURI, 2003). A  $\kappa$ -caseína é importante na estabilidade da micela de caseína e, a sua degradação pode resultar na

coagulação do leite (ADAMS et al., 1976). Esta decomposição da caseína é quantitativamente maior que das proteínas do soro, indicando que primariamente a caseína é atacada pelas enzimas (BENGTSSON ET AL., 1973). O resultado desta degradação leva ao aparecimento de sabores amargos, aumento da viscosidade do leite, geleificação do leite UAT durante o armazenamento e redução do rendimento do queijo (ADAMS, BARACH e SPECK , 1975; SILVEIRA, 1998; ORDOÑEZ et al, 2005).

ADAMS et al. (1976) detectaram degradação da  $\kappa$ -caseína antes da população bacteriana atingir  $10^4$  UFC/mL. A  $\beta$ -caseína foi mais degradada que a  $\alpha$ -caseína. Alguns psicotróficos (cepas de *Pseudomonas*) também degradaram as proteínas do soro.

Alguns autores observaram ainda um aumento da fração proteose-peptona no leite cru estocado a 6°C, sempre que a contagem de psicotróficos alcançava  $3 \times 10^6$  UFC/mL (ALMEIDA & FILHO, 1993). No entanto, não é necessária a presença de grandes populações de microrganismos psicotróficos para que haja a produção de quantidades significativas de proteases (COUSIN, 1982; KOHLMANN et al., 1991).

Quantidades relativamente altas de proteases são produzidas a temperatura de refrigeração (4 a 7 °C). Alguns autores têm observado que a estocagem do leite a 2 °C inibe a produção de proteases por *Pseudomonas spp.* (COUSIN, 1982, SHAH, 1994) Embora as proteases apresentem maior atividade a 30-45 °C, elas também são significativamente ativas a 4°C (COUSIN, 1982). Esta atividade proteolítica dos microrganismos psicotróficos tem como conseqüência a estimulação do crescimento de Bactérias Ácido Lácticas (LAB) em leite. Provavelmente este estímulo ocorra porque as LAB podem utilizar peptídeos aminoácidos, que se acumulam no leite a partir da ação dos psicotróficos (SHAH, 1994).

ADAMS et al (1975) citado por MOURA (1999) trabalhando com psicotróficos isolados de leite cru relataram que estes produzem proteases resistentes à 149°C por 10 segundos, e que aproximadamente 70 a 90% das amostras de leite cru analisadas, apresentaram microrganismos psicotróficos capazes de produzir estas enzimas.

A destruição de proteases bacterianas pode ser possível, quando estas são submetidas à temperatura de 55 °C durante 1 hora, antes do processo de pasteurização, podendo ocorrer uma reativação de 3% da atividade proteolítica (BARACH et al. (1976); SHAH, 1994).

ADAMS et al. (1975) verificaram que a 149°C, a protease MC 60 (usada como modelo de protease) apresentou aproximadamente 400 vezes mais resistente ao calor que o esporo PA 3679, e 4000 vezes mais resistente que o esporo de *B. stearothermophilus*, microrganismos indicadores do processo de esterilização do leite UAT. O tratamento a 149°C

por 4 segundos destruiu menos que 10% das proteases. Resultados semelhantes forma encontrados por BARACH et al. (1976).

Baixas quantidades de proteases podem produzir sabor amargo antes de sinais visíveis de deterioração e altas quantidades podem causar clareamento do leite (ADAMS et al., 1975). O sabor amargo é resultante da liberação de peptídeos amargos. A continuação da proteólise resulta em sabores e odores pútridos associados a produtos de degradação de baixo peso molecular, tais como amônia, aminas e sulfetos (KRAFT & REY, 1979; COUSIN, 1982, ARCURI, 2003).

Esta ação das proteases em leite estocado tratado termicamente e em derivados do leite pode apresentar grande impacto econômico (LAW, 1979).

Destacam-se, entre as alterações, resultantes da ação de proteases de psicotróficas, fenômenos como a “gelificação” e a formação gradual de um sedimento em leites submetidos ao tratamento UAT estocados a 20°C (LAW, 1979; COUSIN, 1982; STEAD, 1983; FAIRBAIRN & LAW, 1986; PRATA, 2001). Na “gelificação” observa-se que a  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína encontram-se extensivamente degradadas, com alguma perda da fração  $\alpha$ -s1, predispondo o leite à coagulação quando submetido ao tratamento térmico por UAT (LAW, 1979; PRATA, 2001).

Somam-se, a esses defeitos, diversos outros problemas, como a queda no rendimento de derivados lácteos, pouca consistência do coágulo formado durante fabricação de queijos, (THOMAS & THOMAS, 1973b; COUSIN, 1982; FAIRBAIRN & LAW, 1986; KOHLMANN et al., 1991; PRATA, 2001).

COUSIN (1982) observou um considerável aumento no nitrogênio total em soros de leites inoculados com psicotróficos. Esses dados sugerem que os psicotróficos podem ter efeitos sobre o rendimento do queijo. O rendimento do queijo ácido feito com leite inoculado com psicotróficos diminui quando o nível de inoculação desses microrganismos aumenta. A redução do rendimento resulta tanto na degradação de lipídeos como de proteínas.

FOX (1989) citado por ALMEIDA (1998) observou que as lipases produzidas pelos psicotróficos são mais importantes no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos do que as proteases; isto porque as proteases são solúveis em água e são perdidas no soro, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo.

HICKS et al (1982) citado ALMEIDA (1998) observaram também um aumento na acidez do leite contaminado por psicotróficos durante a estocagem, levando a produção de

queijos de acidez também elevada, o que também resulta em diminuição do rendimento de queijos.

No iogurte alterações são menos evidentes porque o baixo pH do iogurte não favorece o crescimento dessas bactérias (ARCURI, 2003).

### 3.5.2 Lipólise

A lipase do leite é uma glicoproteína (PM 62.000 a 66.000), que atinge sua maior atividade em pH 7 a 8, embora seu intervalo de atuação seja bastante amplo, pode hidrolisar triglicerídeos de cadeia curta e longa, fosfolípidos, monoglicerídeos e ésteres sintéticos (ORDOÑEZ et al,2005). Embora o leite já contenha ácidos graxos livres, resultantes de uma síntese incompleta na glândula mamária, o grande número desses, é proveniente da hidrólise dos triglicerídeos por lipases. Esta hidrólise provoca o aumento da fração de ácidos graxos de cadeia curta (C-4 a C-8), conferindo aos produtos lácteos sabor e odor de ranço. Ácidos graxos de peso molecular maior (C-10 a C-12) produzem sabor e odor de *sabão*. Ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise podem ser oxidados a cetonas e aldeídos, produzindo sabor oxidado ou metálico (MOURA, 1999; GOMES, 1988; ARCURI, 2003; ORDOÑEZ et al,2005).

O leite possui uma lipase endógena, cuja temperatura ótima é 37°C e pH 8, sendo esta termoestável. Além dessa lipase, pode haver enzima de origem microbiana. Essas lipases de origem bacteriana têm uma atuação ótima em pH alcalino e temperaturas entre 40 e 50°C, sendo termoestáveis e resistindo ao tratamento UAT (ORDOÑEZ et al,2005).

Outra enzima produzida por alguns psicotróficos como *Bacillus cereus* e algumas espécies fluorescentes de *Pseudomonas*, é a fosfolipase C que é importante na deterioração do leite (COUSIN,1982; MUIR,1990). Esta enzima degrada a membrana dos glóbulos de gordura facilitando a ação das lipases sobre os triglicerídeos do leite. (GARG, 1990; SHAH, 1994; COUSIN, 1982).

Derivados lácteos como cremes, queijos e manteigas são os principais alvos da ação das lipases, as quais são capazes de provocar o fenômeno da rancidez na manteiga em dois dias (LAW, 1979; COUSIN, 1982).

## 3.6 – HIGIENE NA PRODUÇÃO DO LEITE

A prática do resfriamento do leite requer a correta higienização dos tanques de armazenamento, equipamentos e tubulações de ordenha (THOMAS & THOMAS, 1973a; STONE & ZOTTOLA, 1985; STEAD, 1987; MOSTELLER & BISHOP, 1993). No entanto,

devido à complexidade de seus componentes, muitas vezes esses equipamentos não são higienizados corretamente e os resíduos de leite, contaminados com bactérias, tendem a se acumular em sua superfície (STEAD, 1987).

Higienização adequada dos equipamentos e utensílios que entram em contato com o leite resulta em baixas contagens bacterianas no leite. Porém, se a higienização é deficiente uma diversidade de bactérias poderão estar presentes nos resíduos remanescentes nos tanques, equipamentos e tubulações de ordenha, representada principalmente por coliformes e outros bastonetes Gram-negativos (COUSIN, 1982; STONE & ZOTTOLA, 1985; MOSTELLER & BISHOP, 1993). Válvulas, canos, peças de borracha usadas na vedação podem contribuir com essa contaminação (THOMAS & THOMAS, 1973a; COUSIN, 1982). Nesses locais, a quantidade de microrganismos psicotróficos pode ser de 10 a 100 vezes maior que a presente nas partes metálicas (COUSIN, 1982). Tal fato pode ser justificado pela presença de inúmeras micro-fissuras por toda a superfície das peças de borracha usadas na vedação dos equipamentos de ordenha, oferecendo excelentes condições para o desenvolvimento desses microrganismos. Além de protegê-los da ação dos sanitizantes, essas fendas podem favorecer a formação de biofilmes, capazes de prejudicar a eficácia dos procedimentos de higienização (MOSTELLER & BISHOP, 1993).

Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos compostas por densos agregados de células microbianas embebidas em uma matriz viscosa (JAYARAO & WANG, 1999; MOSTELLER & BISHOP, 1993).

Nos biofilmes, a primeira camada de bactérias adere diretamente à superfície colonizada e as outras camadas aderem à camada basal por meio de uma matriz polissacarídica. Estudos revelaram que bactérias em situação de deficiência nutricional demonstram um aumento na sua capacidade de aderência a superfícies (JAYARAO & WANG, 1999; MOSTELLER & BISHOP, 1993).

Um processo de higienização, conhecido por CIP (“Clean-in-place”), é utilizado em muitos equipamentos na indústria de laticínios. Apesar da praticidade, se este processo não for realizado adequadamente, pode permitir o desenvolvimento de uma microbiota psicotrófica nos equipamentos mal higienizados (STONE & ZOTTOLA, 1985; STEAD, 1987; CHANDLER & RICHARDS, 1996). Isso ocorre principalmente por problemas nos formatos dos tanques e equipamentos, que dificultam a correta higienização, além da necessidade de manutenção mais freqüente (CHANDLER & RICHARDS, 1996).

Avaliando a eficácia dos produtos usados na sanitização dos tanques e equipamentos de ordenha, MOSTELLER & BISHOP (1993) observaram que agentes como o iodoformo,



hipoclorito, ácido aniônico, ácido peroxiacético, quaternário de amônio apresentaram resultados satisfatórios quando a sua ação foi testada sobre suspensões bacterianas. No entanto, quando a eficácia dos mesmos sanitizantes foi avaliada sobre as bactérias aderidas nos biofilmes, a redução foi considerada insatisfatória. Pode-se concluir com isso que as células bacterianas envoltas pela camada de glicocálice são menos susceptíveis à ação dos sanitizantes aplicados nas concentrações normais.

Culturas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi* foram utilizadas para avaliar a eficácia de sanitizantes, em suspensões bacterianas e biofilmes, em tiras de aço inoxidável. Todos os sanitizantes utilizados mostraram-se efetivos contra as suspensões bacterianas e biofilmes quando se utilizou o tempo recomendado de exposição, com redução de 4 a 5 log na contagem bacteriana. No entanto, quando os tempos de exposição foram reduzidos, observaram-se diferenças nas performances dos sanitizantes sobre os biofilmes (QUALITY, 1996).

Assim, a melhor forma de se evitar a contaminação do leite por bactérias aderidas nos equipamentos de ordenha é realizando uma correta higienização dos equipamentos, após cada utilização, respeitando-se as concentrações, pH e os tempos de exposição preconizados para cada detergente e agente sanitizante, assim como a temperatura da água utilizada na limpeza, evitando-se a formação dos biofilmes (COUSIN, 1982; STONE & ZOTTOLA, 1985; MOSTELLER & BISHOP, 1993; CHANDLER & RICHARDS, 1996).

---

## **Capítulo 4: Estado da Arte**

---

## **4. Estado da arte**

O leite ao ser sintetizado e secretado nos alvéolos do úbere é estéril, mas ao ser retirado, manuseado e estocado na fazenda pode se contaminar com microrganismos originários da superfície das tetas e do úbere e de utensílios, como os equipamentos de ordenha e de armazenamento (COUSINS, 1972, SLAGHUIS, 1996, SUMNER, 1996).

Em trabalho realizado por SANT'ANNA et al. (2000) citado por BRITO & BRITO (2002), fez-se à análise financeira da aquisição de tanque para a refrigeração de leite com volumes de 250, 500 e 1.000 litros. Os resultados mostraram que, do ponto de vista financeiro, os investimentos em tanques de 250 litros não são recomendáveis. Este fato reforça os argumentos que sugerem a exclusão de um grande contingente de produtores, com a implantação da coleta a granel. Uma estratégia recomendável para o sucesso do empreendimento seria a busca pelo aumento no volume do leite produzido nas propriedades rurais, o que pode ser favorecido por programas eficientes de assistência técnica e extensão rural.

Outra estratégia para este segmento tem sido a associação em pequenos grupos e aquisição de tanques de refrigeração de uso comunitário, como forma de reduzir os custos (SANTOS, 1999, DASSIE, 2000). Além da redução de custos, observa-se uma melhoria no preço do leite pago aos produtores, com o aumento de escala contribuindo para uma melhor negociação com a indústria compradora do produto.

Os procedimentos para a obtenção e manutenção do leite com qualidade higiênica adequada são conhecidos (BRITO & BRITO, 2002). A limpeza efetiva dos recipientes, utensílios e equipamentos usados na ordenha, a qualidade da água utilizada na limpeza, o estado sanitário do rebanho, a limpeza do local e a higiene pessoal são fatores que determinam a qualidade microbiológica do leite.

No Brasil, o sistema de refrigeração do leite na fazenda, tanto em tanques de refrigeração de uso individual ou de uso coletivo, e sua coleta a granel iniciou-se, de forma incipiente em 1996, como uma alternativa da indústria e exigência do mercado consumidor para produtos de melhor qualidade. Atualmente, a granelização é uma realidade que atinge grande parte da produção brasileira. Uma questão que se levanta é quanto ao impacto econômico que este sistema representa a médio prazo para o pequeno produtor de leite. Produtores com menos de 50 litros de leite/dia não produzem em escala suficiente que

remunere os investimentos necessários à aquisição e manutenção do tanque de refrigeração individualmente (SANTOS, 1999).

BRUM *et al* (2004) analisaram amostras de leite cru coletado de tanques a granel produzidos nos estados do Paraná e Santa Catarina, durante os meses de janeiro a julho de 2003. Esses autores verificaram que embora a implantação do processo de granelização tenha trazido benefícios econômicos pela redução, por exemplo, do custo de transporte do leite devido à diminuição na frequência da coleta nas propriedades, os níveis de contaminação por microrganismos psicotróficos tornaram-se uma séria preocupação. Pois este grupo inclui microrganismos deterioradores bem como patogêneos para o homem. Sendo assim, é importante a ação não só por parte das indústrias, mas também por todos os envolvidos no setor lácteo promover ações que levem a redução desse tipo de contaminação, o que conseqüentemente, contribuirá de forma significativa para a oferta de produtos lácteos com mais qualidade e segurança alimentar.

MENDONÇA *et al.* (2001) observaram que em 97% das propriedades visitadas o pessoal encarregado pelo transporte do leite não seguiam as normas de higiene básicas, tais como lavar as mãos antes da coleta das amostras, o que pode comprometer a qualidade microbiológica do leite. Foi constatado também que em 28,6% dos estabelecimentos havia a carência de treinamento ou de informações básicas sobre higiene, análises preliminares do produto e coleta de amostras.

PINTO *et al* (2004) avaliaram o cumprimento de itens da Instrução Normativa 51 de 2002 do Ministério da Agricultura (MAPA) por meio da aplicação de uma lista de verificação em todas as propriedades que possuíam tanques de refrigeração por expansão direta no município de Viçosa. Dentre os 17 itens avaliados, apenas 41,2% estavam de acordo com todas as exigências. Porém, constatou-se que em 85,7% dos locais onde os tanques estavam instalados, as janelas ainda não apresentavam telas de proteção. Em 57,1% das propriedades o tempo entre a ordenha e a chegada do leite ao tanque de refrigeração era superior ao limite máximo permitido, que é de 60 minutos e os procedimentos de higienização dos latões não atendiam às recomendações da Instrução Normativa 51. Em 42,9% dos casos a higiene pessoal dos funcionários encarregados pelo recebimento do leite e o registro em formulários próprios da temperatura e do volume do leite, estava em desacordo. A falta de treinamento ou de informações básicas sobre higiene, análises preliminares do produto e coleta de amostras foram verificadas em 28,6% dos estabelecimentos. Baseados nestes resultados os autores citam a necessidade de treinamento, implementação e monitoramento das boas práticas de produção e armazenamento do leite refrigerado de forma que a matéria-prima possa atender

aos padrões propostos pela legislação vigente, minimizando os problemas de qualidade associados à atividade enzimática de bactérias psicotróficas.

SOUZA et al.(1999), MENDONÇA, et al. (2001) E BRITO et al. (2002) verificaram em seus estudos altas contagens de psicotróficos, da ordem de  $10^5$ - $10^8$  UFC/mL em leite cru refrigerado. No entanto, esses autores citam que a composição da microbiota predominante é pouco conhecida, além das propriedades hidrolíticas dessas bactérias. O conhecimento da composição desta microbiota pode subsidiar tomadas de decisões relacionadas a qualidade higiênica e aptidão tecnológica do leite cru, garantindo sua melhor qualidade e de seus derivados.

REINHEIMER et al. (1990) em estudos realizados na Europa e Estados Unidos encontraram prevalência de *Pseudomonas*. De 321 espécies de psicotróficos, 223 (65,4%) eram Gram negativos, sendo deste total 51,1% de *Pseudomonas*. Entretanto em trabalho de isolamento realizado por PRABHA et al (1996) o gênero *Aeromonas* constituiu a maior proporção seguido do gênero *Pseudomonas*.

PRABHA et al (1996) isolou 46 espécies de Gram-positivas entre as 300 espécies isoladas de leite, produtos derivados do leite e ambiente industrial. *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterim*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram os gêneros mais encontrados.

ZALAZAR E MEINARDI (1992) avaliaram o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos em leite a três temperaturas: 0°C, 4°C e 6°C e verificaram o aparecimento de alterações e defeitos em contagens superior a  $10^6$  UFC/mL, nas temperaturas de 4°C e 6°C, estes resultados foram confirmado por ALMEIDA (1998).

PINTO (2004) estudou a atividade proteolítica e a estabilidade de amostras de leite inoculados, com  $10^4$  UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens*, durante 24 horas a 2°C, 4°C, 7°C e 10°C. Constatou-se que as temperaturas de 2°C e 4°C serviram para o controle do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* com 24 horas de incubação. Após este tempo a população dessa bactéria foi de aproximadamente,  $10^4$  UFC/mL a 2°C,  $10^5$  UFC/mL a 4°C,  $10^6$  UFC/mL a 7°C e de  $10^7$  UFC/mL a 10°C. A maior proteólise ocorreu no início da fase estacionária de crescimento. O tempo para a perda de estabilidade térmica foi maior nas temperaturas de 7°C e de 10°C. Baseado nestes resultados concluiu-se que, mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação, para a conservação do leite na fonte de produção e no estabelecimento industrial, pode ocorrer a perda da qualidade da matéria-prima se, um controle efetivo de sua contaminação inicial não for realizada. Além disso, a rapidez, a

temperatura e o tempo de resfriamento são fatores que devem ser considerados para a obtenção de produtos lácteos de alto padrão de qualidade.

---

## **Capítulo 5: Metodología**

---

## **5. Metodologia Experimental**

Este projeto foi realizado no laboratório de Microbiologia do Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Leite, em Juiz de Fora – MG, no período de maio de 2003 a agosto 2005.

Na figura 5.1 é apresentado o esquema de coleta, isolamento e identificação dos isolados bacterianos do leite refrigerado.

### 5.1. Coleta das Amostras:

Foram coletadas amostras de leite cru refrigerado de 20 tanques de refrigeração comunitários e 23 tanques de refrigeração individuais, na região da Zona da Mata, Minas Gerais, durante doze (12) meses.

Estas amostras foram coletadas após homogeneização do leite por meio de agitação mecânica programada no próprio tanque. Em seguida, foram coletadas cerca de 500 ml de leite utilizando-se um coletor de aço inoxidável e frascos estéreis. O transporte das amostras, até o laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, foi em caixa isotérmica contendo gelo.

### 5.2. Contagem, Isolamento e identificação de bactérias psicotróficas.

No laboratório, foram realizadas as diluições apropriadas das amostras, e estas foram plaqueadas em “Plate Count Agar” (Difco). Após incubação a 7 °C durante 10 dias (FRANK et al., 1992) fez-se a contagem das unidades formadoras de colônias e isolou-se cinco colônias por placa selecionada, em Ágar Nutriente-AN (Difco), que foram incubadas a 21 °C por 24 horas, para realização dos primeiros testes: morfologia celular, reação de KOH 3%, coloração de Gram, metabolismo oxidativo e/ou fermentativo da glicose (OF), oxidase, catalase e crescimento em Agar MacConkey (MC) (BARROW & FELTHAN, 1995).

As culturas foram estocadas a temperaturas de -20 °C e -80 °C em meio à base de leite desnatado e glicerol. Para a realização de novos testes, estas culturas foram ativadas e repicadas, com o auxílio de uma alça de platina, semeadas em placas de Petri contendo AN (Ágar nutriente) ou BHI (*Brain Heart Infusion agar* - Difco) e incubadas a 21°C por 24 horas.



Foram isoladas 309 estirpes procurando-se identificá-las ao nível de gêneros e possivelmente de espécie. Além dos testes citados a cima, os isolados bacterianos também foram analisados através destes testes: produção hidrólise da arginina, motilidade, produção de H<sub>2</sub>S e indol em meio SIM, presença de esporos, Agar de Ferro e Açúcar tríplice (TSI), Teste de Vermelho de metila (VM), Teste de Vogues-Proskauer (VP), Teste de Citrato, Teste de resistência a lisostafina, Tipo de hemólise (BARROW & FELTHAN, 1995), Agar Lisina Ferro (LIA segundo QUINN *et al.*, 1999), Teste de Urease (segundo RIBEIRO & SOARES, 1998). E produção de ácido a partir de carboidratos usando Kits (bioMérieux) e segundo FACKLAM & ELLIOTT, 1995.

Posteriormente os isolados bacterianos foram identificados a partir de subcultivos em placas contendo meio BHI (*Brain Heart Infusion agar* – Difco) ou AN (*Ágar nutriente*), e diferenciados em gêneros e espécies, utilizando-se os resultados dos testes citados anteriormente : morfológicos, coloração de Gram, produção de catalase, oxidase, metabolismo fermentativo/oxidativo, crescimento em meio Mac Conkey, reação de KOH 3%, hidrólise da arginina, motilidade, produção de H<sub>2</sub>S e indol em meio SIM e presença de esporos (BARROW & FELTHAN, 1995, e pelo Sistema API 20E, API 20NE, API Staph, API Coryne ou API 50 CH (BioMérieux).

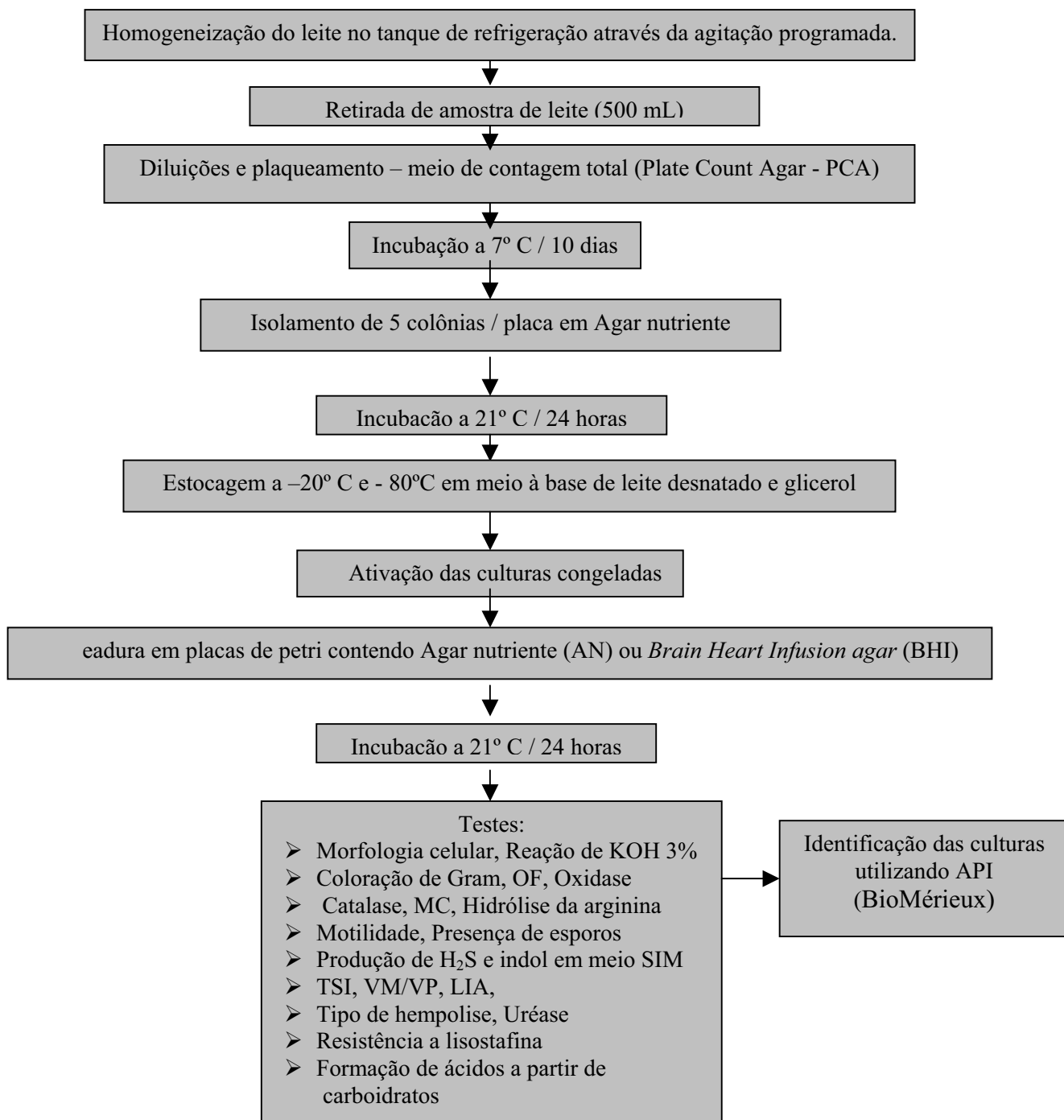


Figura 5.1 – Esquema da coleta, isolamento e identificação dos isolados bacterianos do leite refrigerado (FRANK et al, 1992).

### 5.3. Testes de caracterização dos microrganismos

#### 5.3.1 Reação de KOH 3% (segundo QUIN et al., 1999)

Colocou-se uma gota de KOH a 3% (p/v) em uma lâmina de vidro e suspendeu-se uma colônia retirada de um crescimento em placa de AN. Homogeneizou-se bem, com a ajuda de alça de platina, e realizou-se a leitura dentro de 60 segundos.

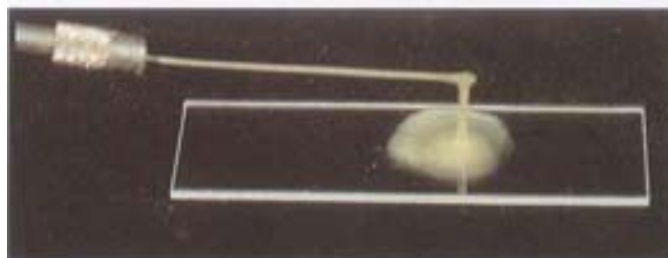


Figura 5.2 - Reação de KOH 3%

#### **Interpretação dos resultados:**

Gram negativas – formação de um filamento viscoso.

Gram positivas – não há produção de viscosidade na suspensão.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Escherichia coli* – KOH positivo

*Staphylococcus aureus* – KOH negativo

#### 5.3.2 Coloração de Gram (segundo MAHON et al. 1997)

O esfregaço foi preparado a partir de uma colônia bacteriana suspensa em água estéril. Após fixação do esfregaço em chama de bico de Bunsen, este foi corado com a solução de violeta genciana fenicada por um minuto, escorrendo ao final sem lavar; e a seguir cobriu-se a lâmina com lugol fraco e deixou atuar por um minuto; lavou-se com solução descorante (à base de álcool-acetona) até que o líquido se tornar incolor (15 – 30 segundos); lavou em água corrente e cobriu-se a lâmina com fuscina para Gram, deixando atuar por 30 – 60 segundos (indicado para anaeróbicos); e, por fim, lavou-se com água corrente, deixando secar na posição vertical e observou-se ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x de aumento total), (BARROW & FELTHAM, 1993).

#### **Interpretação dos resultados:**

Bactérias Gram negativas – As células apresentam coloração de tonalidade avermelhada.

Bactérias Gram positivas – As células apresentam coloração púrpura escura.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Escherichia coli* – Bactéria Gram Negativa

*Staphylococcus aureus* – Bactéria Gram Positiva

### 5.3.3 Motilidade no meio SIM e teste de produção de Indol (segundo BARROW & FELTHAM, 1993).

O teste de motilidade foi realizado em um meio SIM (Biobás). O meio foi inoculado com uma colônia isolada da bactéria (18 - 24 horas de incubação) através de uma picada com agulha de níquel-cromo. O tubo inoculado foi incubado a 30 °C, durante 48 horas. Após 48 horas foram utilizadas algumas gotas do reagente de Kovacs para a reação de indol (COWAN, 1993).

#### **Interpretação dos resultados:**

Meio turvo - motilidade positiva

Produção de H<sub>2</sub>S – meio escuro – positivo

Indol - desenvolvimento de um anel vermelho escuro na superfície do tubo = positivo.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Escherichia coli* – Indol positivo

*Enterobacter aerogenes* – Indol negativo

### 5.3.4 Teste de Catalase (segundo QUIN et al., 1999).

Uma colônia foi colocada em uma lâmina de microscópio limpa. Em seguida adicionou-se, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, homogeneizando-se o conteúdo. A presença de bolhas de gás dentro de alguns segundos, indicava uma reação positiva.



Figura 5.3 – Reação de Catalase: negativo à esquerda e positivo a direita

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Listeria sp.* – Bactéria catalase positiva

*Streptococcus agalactiae* – Bactéria catalase negativa

### 5.3.5 Teste de OF (segundo QUINN et al, 1999).

As bactérias foram semeadas em dois tubos contendo o meio de Hugh Leifson, pH 7,1, usando agulha (inoculação por picada em profundidade). Foi adicionado a um dos tubos óleo mineral estéril (5 a 6 mm altura), para criar um ambiente de anaerobiose. Incubou-se a 30 °C e examinou-se diariamente durante 14 dias, pois alguns microrganismos só produzem ácidos (resultado da utilização da glicose) após vários dias de incubação.

#### Interpretação dos resultados:

**Fermentativa** .....Enterobactérias como *Escherichia coli*

**Oxidativa** .....*Acinetobacter, Pseudomonas*

**Sem reação** .....*Alcaligenes faecales*

Esquema de identificação:

Utilização da Glicose	Tubo aberto	Tubo com óleo
Por oxidação	Amarelo	Verde
Por fermentação	Amarelo	Amarelo
Sem reação	Verde ou azul	verde

5.3.6 Produção de Amônia a partir da Arginina (Meio semi-sólido de THORNLEY)  
Segundo, BARROW & FELTHON, 1993 (Third edition) e WILKIE F. HARRIGAN, 3<sup>a</sup> ed, 1998.

O teste foi realizado com uma colônia da placa de AN ou BHI. Com o auxílio de uma agulha de níquel, a cultura foi inoculada ao meio semi - sólido (método de Thornley, 1960). A superfície do tubo foi coberta com óleo mineral estéril e incubada a temperatura ótima de crescimento (30 °C) por dois a sete dias.

**Interpretação dos resultados:**

Arginina positiva - hidrólise da arginina com formação de amônia indicada pela mudança de cor de salmão para rosa.

Arginina negativa - sem mudança de coloração.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Pseudomonas* – Arginina positiva

*Enterobacteriaceae* – Arginina negativa

5.3.7 Crescimento em meio Mac Conkey (MC) (RIBEIRO & SOARES, 1998).

O MC é seletivo para bactérias Gram-negativas porque possui sais de bile e de cristal violeta, que interferem no metabolismo das bactérias Gram-positivas. É também diferenciador devido à presença de lactose na sua composição, distinguindo as bactérias que fermentam a lactose (LAC<sup>+</sup>) das que não fermentam (LAC<sup>-</sup>). Este meio possui como indicador de pH o vermelho neutro, cuja cor a pH ácido é rosa e pH alcalino é incolor.

Este teste foi usado para verificar se a bactéria era gram-negativa e para observar se a mesma fermentava ou não a lactose.

As culturas puras foram semeadas com a ajuda de uma alça de platina e semeadas em Agar MC, sendo incubadas a 21 °C por 24horas.

**Interpretação dos resultados:**

- Fermentam a lactose (LAC<sup>+</sup>) - formam colônias róseas ou vermelhas.

- Não Fermentam a lactose (LAC<sup>-</sup>) – não formam colônias róseas ou vermelhas.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Escherichia coli* – Bactéria que fermenta a lactose

*Listeria sp.* – Bactéria que não fermenta a lactose e não cresce neste meio.

### 5.3.8 Teste de Oxidase (tiras de oxidase Laborclin)

Para este teste utilizaram-se tiras de papel contendo o reagente p-fenilenodiamina (Laborclin). Utilizando-se um palito de madeira estéril foi transferido assepticamente uma ou duas colônias recém isoladas (18-24h de cultura em AN a 21 °C) e homogeneizada sobre a superfície da tira.

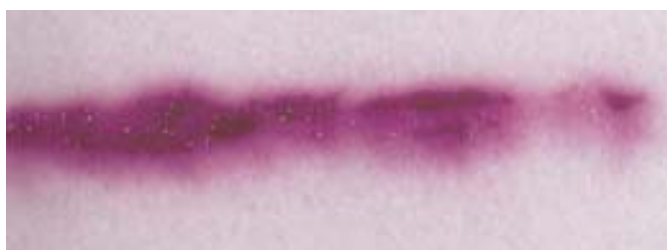


Figura 5.4 – Teste de Oxidase: Método com papel filtro

#### **Interpretação do resultado:**

Bactéria Oxidase positiva - há desenvolvimento de uma coloração violeta, quando a Bactéria bactéria é colocada em contato com a fita indicadora.

Oxidase negativa - não há desenvolvimento de coloração

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Escherichia coli* – Bactéria oxidase negativa

*Pseudomonas aeruginosa* – Bactéria oxidase positiva

### 5.3.9 Teste de TSI (Agar de Ferro e Açúcar tríplice) (segundo QUINN et al., 1999).

O teste foi feito inoculando-se por picada a base (crescimento em anaerobiose) do meio TSI (Difco) e a seguir a parte inclinada (aerobiose) até a extremidade final fazendo uma estria em “zigue-zague”.

#### **Interpretação dos resultados:**

\* Inclinação vermelha (alcalino) e fundo amarelo (ácido): apenas fermentação da glicose.

\* Inclinação amarela (ácida) e fundo amarelo (ácido): fermentação da glicose juntamente com a lactose e/ou sacarose.

\* Meio preto: produção de H<sub>2</sub>S (*Salmonella*).

\* Produção de gás: presença de gás no meio.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Salmonella* – Bactéria que produz gás, H<sub>2</sub>S e fermenta a glicose (base alcalina e fundo amarelo)

*Coliformes* – E. coli

#### 5.3.10 Teste de Vermelho de metila (VM) (segundo QUINN et al., 1999).

Esta prova bioquímica foi utilizada para caracterizar os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

O teste foi realizado utilizando-se uma colônia da placa de AN ou BHI crescida a 21 °C por 18 a 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina a cultura foi inoculada ao meio, e em seguida incubada a 30 °C por até cinco dias. Após incubação, adicionaram-se algumas gotas do indicador VM.

##### **Interpretação do resultado:**

Positivo – meio muda de cor para vermelho.

Negativo – meio permanece amarelo.

Meio com coloração alaranjada deve-se continuar a incubação até quatro dias.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Escherichia coli* – Vermelho de Metila positiva

*Enterobacter aerogenes* – Vermelho de Metila negativo

#### 5.3.11 Teste de Vogues-Proskauer (VP) (segundo BARROW & FELTHAM, 1993).

Utilizou-se os mesmos tubos da prova de Vermelho de Metila Após o período de incubação e a realização do teste VM, foi adicionado ao tubo 0,6 mL de solução A ( $\alpha$ -naftol 5%) e 0,2 mL de solução B (hidróxido de sódio 40%). O tubo foi agitado vigorosamente várias vezes para que o oxigênio atmosférico penetrasse e oxidasse a acetoína em diacetila. O KOH atua como agente oxidante e o  $\alpha$ -naftol como catalisador e intensificador de cor. Com o uso de um agente oxidante, a cor produzida desaparece rapidamente, sobretudo porque o



complexo de reação diacetila-peptona pode ser rapidamente oxidado em um composto incolor.

**Interpretação do resultado:**

Teste positivo - quando ocorre a coloração vermelha do meio entre 15 a 30 minutos.

Teste fracamente positivo - quando ocorre a coloração rósea.

Teste negativo - quando ocorre a coloração marrom-esverdeada.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Enterobacter aerogenes* – Vogues-Proskauer Positivo

*Escherichia coli* – Vogues-Proskauer Negativo

5.3.12 Teste de Urease (segundo RIBEIRO & SOARES, 1998).

A partir da cultura crescida em BHI ou AN (cultura com 24 horas de incubação), inoculou-se com uma alça de platina um tubo contendo o meio. Incubou-se a 35 °C por 24 horas ± duas horas. Quando o resultado obtido era negativo, deixava-se o tubo por mais sete dias à temperatura ambiente, pois o resultado ainda poderia ser alterado. Foi utilizado um tubo não inoculado (controle negativo).

**Interpretação de resultados:**

Urease positiva - o meio muda para rosa claro

Urease negativo - o meio se mantém com a cor inicial (amarelo).

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Proteus* – Urease positiva

*Salmonella* – Urease negativa

5.3.13 Teste de Citrato (segundo BARROW & FELTHAM, 1993).

Esta prova bioquímica tem como finalidade a caracterização de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e fundamenta-se em determinar a capacidade dos microrganismos utilizarem o citrato de sódio como única fonte de carbono para seu metabolismo, resultando em alcalinidade do meio.

A partir da cultura crescida em BHI ou AN (cultura com 18 - 24 horas de incubação) inoculou-se com uma agulha de níquel-cromo um tubo contendo o meio Citrato de Simmons (ágar inclinado). O teste foi realizado inoculando-se uma estria sobre a superfície do meio (a agulha é inoculada na parte mais baixa do meio e na inclinação e continua-se voltando até a extremidade final fazendo uma estria única e reta). Incubou-se a 35 °C por 96 horas ± duas horas. Foi utilizado um tubo não inoculado (controle negativo). Os microrganismos que não conseguem utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono não crescem no meio de cultura e o mesmo, permanece com a sua coloração inicial (verde).

**Interpretação de resultado:**

Positiva – alcalinização do meio e viragem do indicador de pH azul de bromotimol para azul.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Enterobacter aerogenes* – Citrato positivo

*Escherichia coli* – Citrato negativo

5.3.14 Lia (Ágar Lisina Ferro) (segundo QUINN et al., 1999).

A partir da cultura crescida em BHI (cultura de 18-24 horas) inoculou-se a colônia a ser analisada no meio de Agar Lisina Ferro através de picada com agulha de platina e estrias na rampa. O Inoculo foi incubado a 35 °C por 24 horas.

Este teste tem como finalidade determinar a presença de lisina de descarboxilase e a produção de sulfato de hidrogênio. É um teste diferencial de culturas. O meio utilizado é sólido, sendo distribuído em tubos de forma inclinada e inoculado com a colônia a ser analisada, através de picada com agulha de platina e estrias na rampa. Foi incubado a 35 °C por 24 horas.

Este meio tem em sua composição: peptona de carne, extrato de levedura, D-glicose (carboidratos), indicador de H<sub>2</sub>S (tiosulfato de sódio e citrato de amônia e ferro III), indicador de pH (púrpura de bromocresol), L-lisina monoclohidratada (aminoácido que será ou não descarboxilado).

A interpretação dos resultados deve ser feita da seguinte forma:

\*Crescimento de ***Salmonella***:

Positivo: o Fundo e a inclinação do meio no tubo alcalinos (púrpura) com produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do meio). Pode ocorrer também ausência de produção de H<sub>2</sub>S. O meio continua alcalino, porque mesmo ocorrendo à fermentação da glicose com produção de ácido, a lisina é descarboxilada, produzindo um composto alcalino (cadaverina) que neutraliza o ácido formado.

*\*Crescimento de **Proteus**:*

O meio adquire uma coloração castanha em função da reação de desaminação da lisina a ácido alfacetocarbônico. Este composto reage com os sais de ferro provocando o aparecimento da cor castanha. O fundo fica amarelo em função da fermentação da glicose.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Salmonella* – LIA positiva

5.3.15 Formação de ácidos a partir de carboidratos (segundo FACKLAM & ELLIOTT, 1995).

Arabinose, inulina, lactose, manose, rafinose, ribose, sorbitol e trealose são os carboidratos utilizados neste teste.

O microrganismo que possui a enzima lactase tem a capacidade de desdobrar a lactose em D-glicose e D-galactose e, com a fermentação desta última, liberar ácidos.

Já o microrganismo que não possui a enzima lactase não libera ácidos e degrada a peptona existente no meio, portanto restará no meio NH<sub>3</sub>.

A formação de ácido a partir de carboidratos foi determinada em meio infusão de coração (HI) contendo 1% do carboidrato específico e o indicador púrpura de bromocresol. O procedimento consiste em transferir várias colônias crescidas em ágar-sangue durante 24 a 48 horas para os tubos contendo os meios específicos para cada carboidrato a ser testado e incubá-los em estufa a 35°C por até 14 dias.

**Interpretação de resultado:**

Reação positiva - coloração do meio muda de púrpura para amarelo.

Reação negativa - a coloração do meio permanece inalterado, ou seja, de coloração púrpura.

Os controles positivo e negativo de cada carboidrato utilizado encontram-se descritos na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Controles positivo e negativo do teste bioquímico de formação de ácidos a partir de carboidratos.

<b>Carboidrato</b>	<b>Controle Positivo</b>	<b>Controle Negativo</b>
Lactose	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus equi</i>
Manose	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Rafinose	<i>Streptococcus suis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Ribose	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Sorbitol	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Trealose	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus equi</i>

#### 5.3.16 Hidrólise do hipurato de sódio (segundo FACKLAM & ELLIOTT, 1995).

Este teste foi realizado em caldo infusão de coração (HI) contendo 1% de hipurato de sódio. O procedimento consistiu em inocular o meio com duas ou três colônias com uma gota do caldo de cultura e incubá-lo a 35°C durante 48 horas. Após o período de incubação, o meio foi centrifugado a 2500 rpm durante 02 minutos e foi pipetado 0,8 mL do sobrenadante e transferido para outro tubo (13 x 100 mm), sendo adicionado 0,2 mL de cloreto férrico e posterior agitação.

#### **Interpretação de resultado:**

Resultado positivo - formação de um precipitado, o qual deve permanecer por mais de 10 minutos. Este precipitado indica a presença de ácido benzóico, resultante da hidrólise do hipurato.

Resultado negativo - Se, após a agitação, o tubo estiver claro e assim permanecer, isto é indicativo de resultado negativo. Uma reação fracamente positiva, ou seja, quando ocorre à formação de pouco precipitado, pode acontecer com algumas amostras.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Streptococcus agalactiae* – hipurato positivo

*Enterococcus faecalis* – hipurato negativo

### 5.3.17 Tipo de hemólise (segundo FACKLAM & ELLIOT, 1995).

A reação de hemólise foi determinada em ágar sangue, o qual é composto de meio TSA (*Trypticase Soy Agar*) e 5% de sangue ovino. As placas de Petri contendo ágar sangue foram inoculadas com as culturas Gram-positivas desconhecidas e incubadas a 35°C por 24 a 48 horas, ou até que se observasse crescimento suficiente. Após o período de incubação, as placas foram examinadas, a fim de verificar a destruição dos eritrócitos. E, por fim, se a destruição de células sangüíneas não for aparente, a reação de hemólise é interpretada como não-hemolítica.

Este teste também foi realizado para determinar qual API de identificação de bacilos Gram positivas poderia ser utilizado para maior confiança do resultado das mesmas.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Streptococcus agalactiae* – hemolítica

*Streptococcus salivarius* – não-hemolítica

### 5.3.18 Teste de resistência a lisostafina

Este teste foi realizado para determinar a resistência das bactérias Gram-positivas isoladas à enzima lisostafina, servindo de base para a determinação de qual API de identificação poderia ser utilizado. As estirpes foram reativas em meio Ágar BHI a 21°C por 24 horas. Em seguida era selecionada uma colônia e inoculada em caldo BHI por mais 24 horas. 0,1mL desta cultura, suspensão bacteriana de cerca de  $10^7$  germes/mL foi semeada por inundação a superfície de uma placa de Agar sangue, deixou-se secar por aproximadamente 10-20 minutos a  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , depositando-se posteriormente à superfície da gelose, uma gota de uma solução de lisostafina a 200 µg/mL. Incubou esta placa por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Foi observado uma lise total ou subtotal da cultura bacteriana indicando uma sensibilidade à enzima. As culturas que não apresentassem nenhuma lise foram consideradas resistentes à enzima em estudo.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Micrococcus* é Resistente

*S. aureus* é Sensível

### 5.3.19 Coloração de Esporos (segundo RIBEIRO & SOARES, 1993).

O esporo bacteriano é uma célula de parede espessa formada no interior de algumas bactérias. É muito resistente ao calor, à dessecação e a outros agentes químicos e físicos; é capaz de permanecer em estado latente por longos períodos e, em seguida, germinar, dando origem a uma nova célula vegetativa.

As bactérias caracterizadas pela coloração de Gram como sendo bacilos Gram positivas, foram avaliadas quanto a capacidade de produção de esporos. Estas foram inoculadas (a partir de cultura crescida em BHI) no meio específico para esporulação, 2X SG (extrato de carne, tripton, amido, sulfato de manganês, ágar bacteriológico, glicose). O pH da solução antes de ser esterilizado foi ajustado para 7,0.

As estirpes foram inoculadas no meio 2X SG na proporção de 1:10 e incubada a 30 – 32 °C com agitação mecânica por 4 horas. Em seguida, esta cultura foi diluída na proporção de 1:25, utilizando o mesmo tipo de meio estéril e incubada a 30°C com agitação por mais 24h, para sincronizar a esporulação. No outro dia as culturas foram deixadas sobre a bancada, à temperatura ambiente, por 48 horas. Depois foi feita uma preparação a fresco em lâmina de vidro e também esfregaço corado, para observar se havia esporos. Os mesmos frascos inoculados foram submetidos a três tratamentos para verificar a resistência dos esporos formados: 80°C/10minutos; 5% de clorofórmio; 10% de clorofórmio, as percentagens de clorofórmio foram calculadas sobre o valor restante do meio nos frascos que haviam sido incubados anteriormente por 24h sobre agitação, o volume do frasco era dividido em dois, para os dois últimos tratamentos. Após o tratamento térmico as amostras foram inoculadas em placas de petri contendo o mesmo meio utilizado para o crescimento dos esporos para verificar a resistência dos esporos formados. Já o tratamento com clorofórmio foi acompanhado por um período maior. Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente por aproximadamente 7 dias, durante este período eram agitados manualmente e avaliados quanto a resistência do esporo ao clorofórmio. Esta avaliação era feita em placas de petri contendo o meio 2X SG e incubado a 30°C por até 14 dias. Quando havia formação de colônias era realizada a contagem dos mesmos. Em intervalos de 48 horas era feito o esfregaço a fresco e por coloração de esporos, através do método de Wirtz-Conklin descrito por Ribeiro & Soares (1993).

Este método de coloração dos esporos emprega o verde-malaquita em 5% a quente como corante principal, que resiste à lavagem subsequente com água e, posteriormente, a

safranina (cora as estruturas da célula vegetativa), como corante de contraste. Desta forma, o esporo se cora de verde, porém o resto da célula ou a célula que não possui esporo se tingem em vermelho ou róseo.

Para este teste foram utilizados os seguintes controles:

*Bacillus subtilis* é Resistente, forma esporos.

*S. aureus* é Sensível, não forma esporos.

### 5.3.20 Utilização dos Kits API (BIOMÉRIEX)

Os Kits API são sistemas padronizados de testes rápidos para identificação de bactérias.

Os Kits API foram utilizados de acordo com recomendações. O sistema API foi repetido para 50% dos isolados para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Neste trabalho foram usados os Kits:

\*API 20 NE – utilizado para identificação de bacilos Gram-negativos não enterobactérias e não fastidiosos. Combina oito testes convencionais, 12 testes de assimilação e uma base de dados. A galeria API 20 NE tem 20 microtubos que contêm substratos desidratados, Os testes convencionais foram inoculados com uma suspensão bacteriana salina que constitui os meios. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor espontâneas ou reveladas através da adição de reagentes. Os testes de assimilação foram inoculados com um meio mínimo e as bactérias crescem apenas se foram capazes de utilizar o substrato correspondente. Os testes realizados através deste sistema: NO<sub>3</sub>, TRP (L-triptofano), GLU (D-glucose), ADH (L-arginina), URE (uréia), ESC (esculina citrato de ferro), GEL (gelatina), PNPG (4-nitrofenil-βD-galactopiranosido), ARA (L-arabinose), MNE (D-manose), MAN (D-manitol), NAG (N-acetil-glucosamina), MAL (D-maltose), GNT (potássio gluconato), CAP (ácido caprato), ADI (ácido malato), CIT (citrato de trisódio) e PAC (ácido fenil-acetato).

\*API 20 E – utilizado para a identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos. Engloba 21 mini-testes bioquímicos e uma base de dados. A galeria API 20 E engloba 20 microtubos com substratos desidratados, para a detecção das atividades enzimáticas ou a fermentação de açúcares. As demais informações se comportam como o API 20 NE. Os testes realizados através deste sistema: ONPG (2-nitrofenil-βD-galactopiranosido), ADH (L-arginina), LDC (L-lisina), ODC (L- ornitina), CIT (citrato de sódio), H<sub>2</sub>S (tiosulfato de sódio), URE (uréia), TDA (L-triptofano), IND (L-triptofano), VP (Pirivato de sódio), GEL

(gelatina), GLU (D-glucose), MAN (D-manitol), INO (Inositol), SOR (D-sorbitol), RHA (L-ramnose), SAC (D-sacarose), MEL (D-melibiose), AMY (Amigdalina) e ARA (L-arabinose).

\*API Staph – para identificação dos *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* que comporta mini-testes bioquímicos assim como uma base de dados. A galeria API 20 E engloba 20 microtubos com substratos desidratados. As demais informações se comportam como o API 20 NE. Os testes realizados através deste sistema: GLU (D-glucose), FRU (D-frutose), MNE (D-manose), MAN (D-manitol), MAL (D-maltose), LAC (D-lactose), TER (D-trehalose), XLT (xilitol), MEL (D-melibiose), NIT (nitrato de potássio), PAL ( $\beta$ -naftil fosfato), VP (Pirivato de sódio), RAF (D-rafinose), XYL (D-xilose), SAC (D-sacarose), MDG (metil- $\alpha$ D-glucopiranosido), NAG (N-acetil-glucosamina, ADH (L-arginina) e URE (uréia).

\*API Coryne - sistema padronizado para a identificação de bactérias corineformes, em 24 horas, que utiliza mini – testes e uma base de dados específicos. A galeria API coryne é constituída por 20 microtubos que contêm substratos desidratados para a detecção das atividades enzimáticas ou a fermentação dos açúcares. Os microtubos foram inoculados com uma suspensão bacteriana a ser identificada que re-hidrata os substratos. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor espontâneas ou reveladas pela adição de reagentes. Os testes de fermentação foram inoculados com um meio enriquecido (contendo um indicador de pH) que re-hidrata os substratos açucarados. A fermentação dos carboidratos provoca uma acidificação que se traduz por uma viragem espontânea do indicador de cor. Os testes realizados através deste sistema: NIT (nitrato de potássio), PYZ (pirazina carboxamida), PYRA (ácido piroglutâmico- $\beta$ naftilamida), PAL ( $\beta$ -naftil fosfato),  $\beta$ GUR (ácido naftol-ASBI-glucurónico),  $\beta$ GAL (2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosida),  $\alpha$ GLU (2-naftil- $\alpha$ D-glucopiranosida),  $\beta$ NAG (1-naftil-N-acetil- $\beta$ D-glucosaminida), URE (uréia), ESC (esculina citrato de ferro), GEL (gelatina), LAC (D-lactose), MAN (D-manitol), MAL (D-maltose), SAC (D-sacarose), GLYG (glicogênio), XYL (D-xilose), GLU (D-glucose), RIB (D-ribose) e CAT (catalase).

\*API 50 CH - foi utilizado para identificação de bastonetes gram positivos. É sistema padronizado que associa 50 testes bioquímicos. O API 50 CH foi utilizado em conjunto com o API 50 CHL Médiu para a identificação dos *Lactobacillus* e semelhantes, com API 50 CHB/E Médiu para identificação dos *Bacillus* e semelhantes, das *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*. A galeria API 50 CH é constituída por 50 microtubos para o estudo da fermentação de substratos.

Os Kits foram utilizados segundo as especificações do fornecedor.



Após a incubação das galerias inoculadas, fizeram-se as leituras e a seguir a identificação dos microrganismos através do sistema de identificação APILAB PLUS V.3.3.3. A identificação em nível de espécie foi considerada segundo as especificações da bioMérieux.

#### 5.4. Caracterização das bactérias isoladas quanto à produção de enzimas hidrolíticas

Todos os isolados obtidos foram avaliados quanto a sua capacidade de produção de lipases e proteases. A produção destas enzimas foi avaliada qualitativamente pela formação de halo em torno da colônia e o diâmetro do halo foi medido para uma estimativa quantitativa.

##### 5.4.1 Verificação da atividade proteolítica e lipolítica

Para estes testes foram utilizados os seguintes meios: “Caseinate Agar” (MERCK) com a adição de 1% de leite desnatado para a verificação de proteólise e ágar tributirina para verificação de lipólise. No Agar tributirina era adicionado 1% de tributrin (SIGMA). A partir de cultivo em AN, uma colônia foi diluída de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland, em solução salina (NaCl p/v 0,85%). As placas contendo os meios, foram inoculadas com alças descartáveis de um  $\mu\text{L}$  dentro de 30 minutos do preparo do inóculo. As placas foram incubadas nas temperaturas de 4 , 7 e 10°C e avaliadas durante 10 dias e a 21°C durante 3 dias. Verificando-se a presença de zona clara (halo) ao redor da colônia, o que indicava reação de proteólise ou lipólise. Foram realizadas as medidas dos halos.

#### 5.6 Análise estatística

Os dados referentes às contagens totais foram analisados de forma descritiva do percentual de amostras coletadas em tanques individuais e comunitários quanto ao grau de contaminação, agrupando-os em diferentes faixas de contagens.

As atividades proteolítica e lipolítica foram analisada de forma descritiva, comparando-se as diferentes temperaturas utilizadas, através do teste  $\chi^2$  (Sistema de Análise Estatística – SAS, 1996).

---

## **Capítulo 6: Resultados e Discussões**

---

## **6. Resultados e Discussões**

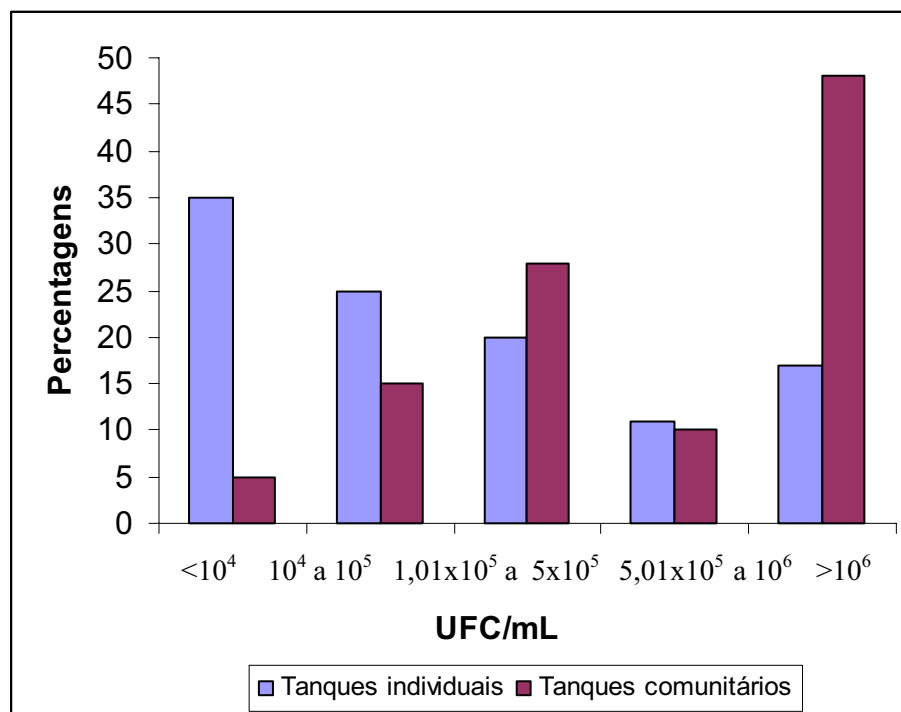
### 6.1 Contagem de bactérias psicotróficas (UFC/ml) – tanques individuais e comunitários

A contagem de bactérias psicotróficas nas amostras de leite foi semelhante para os dois tipos de tanques de refrigeração variando entre  $10^2$  e  $10^6$  UFC/mL. Pinto (2004) encontrou variações um pouco mais amplas para tanques individuais, indo de  $2,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, ao passo que em tanques comunitários o intervalo da contagem foi semelhante ao desse estudo, de  $8,9 \times 10^2$  a  $3,2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. SILVA (2003) também encontrou contagens altas de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru coletadas em silos industriais de processadores de leite UHT dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás. Nessas amostras, as contagens de bactérias psicotróficas variaram entre  $1,4 \times 10^6$  e  $8,8 \times 10^7$  UFC/ml e diferenças significativas foram detectadas em função do Estado e da estação do ano. CUNHA, CARVALHO & ABREU (1996) trabalhando com leite cru tipo B refrigerado na região de Lavras-MG, encontraram resultados variando de  $4,9 \times 10^3$  a  $1,2 \times 10^6$  UFC/ml nas contagens totais de aeróbios mesófilos e  $3,0 \times 10^2$  a  $3,0 \times 10^5$  UFC/ml nas contagens de psicotróficos. Os autores concluíram que estas altas contagens foram resultados de falhas na higienização e estocagem do leite. Resultados semelhantes foram obtidos por SILVEIRA (1997), que observou uma variação na contagem de microrganismos psicotróficos da ordem de  $10^4$  a  $10^8$  UFC/ml durante o período de estocagem do leite, também de Minas Gerais.

Segundo ALMEIDA & FILHO (1993), as mudanças bioquímicas resultantes do crescimento de bactérias psicotróficas no leite passam a ser significativas quando as contagens superam  $10^6$  UFC/mL. Amostras de leite cru com populações iniciais de  $10^4$  UFC/mL podem exceder  $10^6$  UFC/mL quando armazenadas a 7°C por 2 dias ou a 5°C por 3 dias (LAW *et al.*, 1979). Para THOMAS & THOMAS (1973a), contagem de microrganismos psicotróficos menor que  $10^4$  UFC/mL pode ser considerada como padrão satisfatório para leite cru coletado de tanque refrigeradores. Contagens entre  $10^4$  e  $10^5$  UFC/mL indicam a necessidade de melhorias na higiene de ordenha ou na higienização dos equipamentos utilizados e contagens acima de  $10^5$  UFC/mL são um indício definitivo de condições insatisfatórias de produção ou refrigeração do leite na fazenda.

Conhecer somente a faixa da contagem de psicotróficos não é suficiente para se ter um panorama da condição dos tanques analisados. Pensando assim e considerando os índices

mostrados por THOMAS & THOMAS (1973a), os tanques individuais e comunitários foram separados em intervalos de contagens. O número de tanques dentro de cada uma das faixas está expresso em termos de porcentagem do total de tanques, conforme mostra a **Figura 6.1**.



**Figura 6.1** - Distribuição em porcentagem da contagem de microrganismos psicrotróficos (UFC/mL) em leite cru refrigerado em tanques individuais e comunitários.

Observa-se que mais da metade das amostras de leite estocadas em tanques coletivos não atendem aos níveis brasileiros legalmente estabelecidos (BRASIL, 2002), que são os seguintes: para as regiões sul e sudeste contagem máxima de 10<sup>6</sup> UFC/mL a partir primeiro de julho de 2005 ATÉ 2008.

A **Figura 6.1** estes dados sugerem que em tanques comunitários, a mistura de matéria-prima de diversos produtores aumenta os riscos, comprometendo a qualidade final do produto. THOMAS & THOMAS (1973a) afirmam ainda que apenas um ou dois suprimentos de leite cru excessivamente contaminados, com uma microbiota predominantemente psicrotrófica, são suficientes para comprometer a qualidade de um caminhão-tanque inteiro. Os fatores individuais de higiene, manejo e procedimentos de ordenha variam entre os diversos produtores e este aspecto é de crucial importância para a manutenção do leite no tanque em condição microbiológica adequada.

Em trabalho realizado por BRITO *et al.* (2003), foram analisadas, durante um ano, amostras de leite de vinte e dois tanques comunitários de sete municípios da Zona da Mata Mineira. De todos os tanques analisados, somente um atendeu aos parâmetros estabelecidos na legislação. Um elemento diferencial deste tanque era a assistência técnica sistemática recebida pelos produtores por extensionista local da EMATER-MG. Por este exemplo, infere-se que a capacitação de técnicos que prestem assistência aos produtores é de grande importância para o atendimento das metas propostas.

Vale salientar ainda que além dos aspectos quantitativos, aspectos qualitativos devem ser considerados, tendo em vista que a população de microrganismos psicotróficos necessária para causar mudanças indesejáveis no leite varia de acordo com os diferentes gêneros e espécies.

#### 6.2. Identificação dos isolados bacterianos obtidos de leite oriundo de tanques comunitários e individuais

A **Figura 6.2** mostra a distribuição das bactérias psicotróficas observada nas amostras de leite cru refrigerado, segundo a coloração de Gram. Neste estudo obteve-se uma predominância no isolamento de bactérias Gram-negativas (81%). Este resultado está de acordo com outras pesquisas, nas quais bactérias Gram-negativas são consideradas como contaminantes mais frequentes do leite sob refrigeração (COUSIN, 1982; ENEROTH *et al.*, 1998).

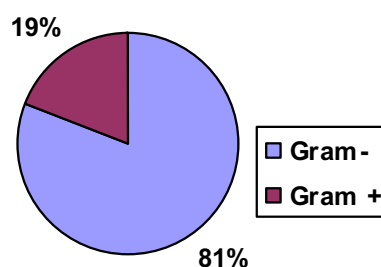


Figura 6.2 - Distribuição de bactérias psicotróficas isoladas de leite cru refrigerado, segundo coloração de Gram.

### 6.3 - Isolados Gram negativos

A identificação dos isolados Gram negativos dos tanques comunitários e individuais utilizando o sistema de identificação APILAB estão apresentadas na **Tabela 6.2**.

A identificação ao nível de espécie foi considerada quando o programa APILAB indicou identidade  $\geq 75,0\%$  ou “boa identificação para gênero”. Os 250 isolados obtidos foram identificados como: *Acinetobacter* spp. (39), *Aeromonas* spp. (07), *A. Hydrophila* (16), *A. sobria* (1), *A. caviae* (1), *Alcaligenes faecalis* (1), *Burkholderia cepacia* (12), *Chryseomonas luteola* (3), *Enterobacter* spp. (1), *Ewingella americana* (6), *Hafnia alvei* (7), *Klebsiella* spp. (1), *Klebsiella oxytoca* (10), *Yersinia* spp. (2), *Methylobacterium mesophilicum* (1), *Moraxella* spp. (4), *Pantoea* spp. (16), *Pasteurella* sp. (1), *Pseudomonas* spp. (10), *P. fluorescens* (94), *P. putida* (3), *Serratia* spp.

O gênero *Pseudomonas* (43%) representou o maior percentual do total de bactérias identificadas, sendo a *Pseudomonas fluorescens* (**Tabela 6.2**) a espécie predominante (37,6%). Estes resultados são consistentes com os de outras pesquisas, em que também foram constatadas que espécies do gênero *Pseudomonas* representam a microbiota psicotrófica deterioradora mais freqüente do leite refrigerado (ADAMS et al., 1975; SILVEIRA et al., 1999; WANG & JAYARAO, 2001; AAKU et al, 2004; PINTO 2005).

Este mesmo predomínio de *Pseudomonas* também foi observado em amostras de leite cru do tipo A presentes em tanques refrigeradores, coletadas em dias alternados sendo também verificado predomínio do gênero *Pseudomonas* nas tubulações dos equipamentos de ordenha. Além disso, quando a coleta do leite cru refrigerado nas fazendas é realizada em dias alternados, costuma-se observar contagens mais expressivas de microrganismos psicotróficos no leite, comparada com a coleta realizada diariamente (COUSIN, 1982).

Tabela 6.1 – Identificação das Bactérias Gram negativas isoladas nos tanques comunitários e individuais utilizando o sistema de identificação API.

Gênero/Espécie	Nº Total de isolados bacterianos = 250		% Identificação sistema API
	Tanques Individuais	Tanques Comunitários	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	65	29	98,6 -99,9
<i>Pseudomonas putida</i>	03	0	99,1
<i>Pseudomonas</i> spp.	10	01	82,3 -99,4
<i>Acinetobacter</i> spp.	15	24	78,9-91,9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	14	92,9 - 99,9
<i>Aeromonas caviae</i>	1	0	98,9
<i>Aeromonas sobria</i>	0	1	83,8
<i>Aeromonas</i> spp.	1	4	85,9-99,9
<i>Pantoea</i> spp.	2	15	* - 99,9
<i>Bukholderia cepacea</i>	12	0	99,9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	9	97,4
<i>Klebsiella</i> spp.	0	1	*
<i>Hafnia alvei</i>	0	7	99,9
<i>Erwingella americana</i>	0	7	92,9 -98,2
<i>Moraxella</i> spp.	4	0	82,2
<i>Chryseomonas luteola</i>	1	2	97,8 - 99,8
<i>Serratia</i> spp.	0	3	*-99,4
<i>Yersinia</i> spp.	2	0	95,7
<i>Enterobacter</i> spp.	1	0	*
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0	1	96,6
<i>Pasteurella pneumo./haemolitica</i>	1	0	99,3
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0	1	99,8
<i>Methylobacterium</i> spp.	1	0	88,2
Não identificados	3	2	
TOTAL	129	121	250

\*Boa identificação para gênero segundo o APILAB Plus v.3.3.3 (bioMérieux)

### 6.3.1 Comparação entre Bactérias Gram negativas predominantes nos tanques comunitários e individuais

Comparando-se o número e tipo de bactérias predominantes nos dois tipos de tanque (Tabela 6.1), observa-se algumas semelhanças. Além do número semelhante de bactérias isoladas em tanques individuais (121) e comunitários (129), as espécies *Pseudomonas flourescens* e *Acinetobacter* spp, foram detectadas de maneira expressiva em ambos os tanques. Os tanques individuais tiveram ainda como predominantes: *Bukholderia cepacea* e os tanques comunitários tiveram *Panthoea* spp.

Segundo JAYARAO & WANG (1999), em amostras de leite cru de tanques comunitários refrigerados, bactérias Gram-negativas não coliformes psicotróficas estavam

presentes em 76,3% dos tanques analisados, valor correspondente a 67,1% do número total de bactérias isoladas. Observaram também que o gênero predominante *Pseudomonas* representava 49,6% do total e 73,9% dentre as bactérias Gram-negativas não coliformes, sendo a espécie *Pseudomonas fluorescens* a mais freqüentemente isolada.

### 6.3.2 Análise das bactérias patogênicas encontradas

Dentre as espécies Gram negativas identificadas (**Tabela 6.1**) algumas são patogênicas: *Serratia* spp., *Moraxella* spp., *Enterobacter* spp., *Erwingella americana*, *Hafnia alvei*, *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp que pode ser uma *P. aeruginosa*. Estes patógenos são considerados oportunistas e estão diretamente ligados à qualidade de água, higienização do ambiente, contato do leite com solo, vegetação. Maior número patogênicas foi encontrado em tanques comunitários quando comparados aos tanques individuais. Nestes primeiros, as patogênicas encontradas em maior número foram *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei* e *Erwingella americana*. As estirpes patogênicas identificadas neste trabalho foram diferentes às reportadas por DESMASURES & GUEGUEN (1997). Estes autores realizaram, durante dois anos, um monitoramento mensal da qualidade microbiológica do leite cru, obtido em boas condições higiênicas e mantido nos tanques de refrigeração de fazendas especializadas. Dentre as bactérias isoladas, alguns microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram ocasionalmente detectados. *Listeria monocytogenes* foi detectada em apenas uma fazenda e a espécie *Yersinia enterocolitica* não foi isolada.



### 6.3.3 Atividade Enzimática

As bactérias Gram negativas isoladas dos tanques individuais e comunitários foram avaliadas quanto a sua atividade enzimática através da formação de halos nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

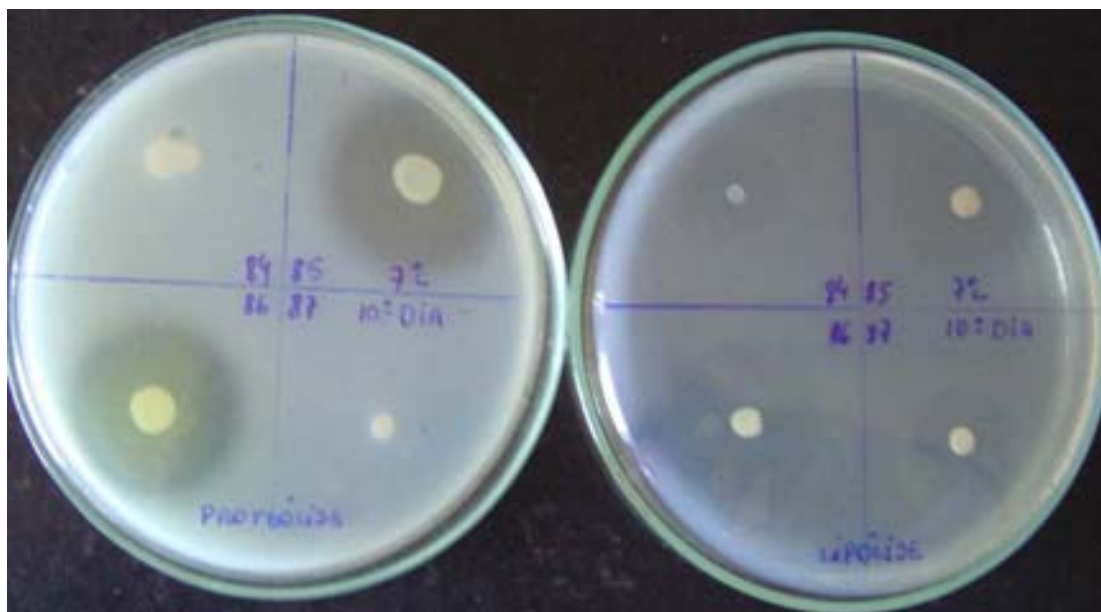


Figura 6.3. Atividade proteolítica e lipolítica evidenciada pela presença de halo em torno da colônia.

A **Figura 6.3** mostra a avaliação qualitativa da produção de proteases e lipases que é expressa pela hidrólise da caseína e dos lipídios do leite através da formação do halo em volta da colônia de crescimento.

As **Tabelas 6.2 e 6.3** mostram o número de bactérias encontradas em tanques individuais e comunitários, respectivamente, que apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica para cada temperatura estudada.

Pode-se observar que a maioria das bactérias isoladas apresentou atividade enzimática à 10°C e 21°C, tanto para os tanques individuais como para os comunitários.

Como já foi comentado anteriormente, nos tanques individuais e comunitários a estirpe mais freqüente foi a *Pseudomonas fluorescens*, que também se mostrou altamente produtora de proteases e lipases. Este resultado é semelhante aos encontrados por BRAMLEY & McKINNON (1990) no trabalho com leite cru refrigerado.

Tabela 6.2 - Avaliação das bactérias Gram negativas quanto a sua atividade enzimática nos tanques individuais, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Gênero ou espécie (número de amostras)	Nº de amostras Total = 250 (incluídos tanques comunitários e individuais)							
	Tanques individuais (129 isolados)							
	Proteólise				Lipólise			
	4°C	7°C	10°C	21°C	4°C	7°C	10°C	21°C
Não identificado (3)	0	0	1	1	2	3	3	3
<i>A hydrophila</i> (6)	0	0	3	1	4	7	6	7
<i>Aeromonas caviae</i> (1)	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>Aeromonas spp</i> (1)	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter spp</i> (15)	0	0	0	0	14	14	11	14
<i>Burkhol. Cepacia</i> (12)	0	0	0	0	12	12	9	12
<i>Chryseomonas luteola</i> (1)	1	1	0	1	1	0	0	0
<i>Enterobacter spp</i> (1)	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Klesbsiella oxytoca</i> (1)	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Methylo. Mesophilicum</i> (1)	0	0	0	0	1	1	1	1
<i>Moraxella spp</i> (4)	0	0	0	0	4	4	2	4
<i>P. fluorescens</i> (65)	49	55	63	61	65	65	59	65
<i>Pantoea spp</i> (2)	0	0	0	0	0	1	2	1
<i>Ps. Putida</i> (3)	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Pasteurella spp</i> (1)	0	0	0	1	1	1	1	1
<i>Pseudomonas spp</i> (10)	1	3	4	2	7	9	6	8
<i>Yersinia spp</i> (2)	0	2	2	2	0	2	2	2

Do total de 250 Gram negativas (Tabelas 6.3 e 6.4), 108 foram identificadas como *Pseudomonas* das quais 60,57% apresentaram atividade proteolítica e lipolítica nas temperaturas de 4, 7, 10 e 21°C. *Pseudomonas* foi o gênero que mais expressou o seu potencial deteriorante.

Das espécies pertencentes aos gêneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, 20% demonstraram apenas atividade lipolítica nestas quatro condições. Algumas estirpes apresentaram atividade enzimática em uma ou duas das três temperaturas estudadas:

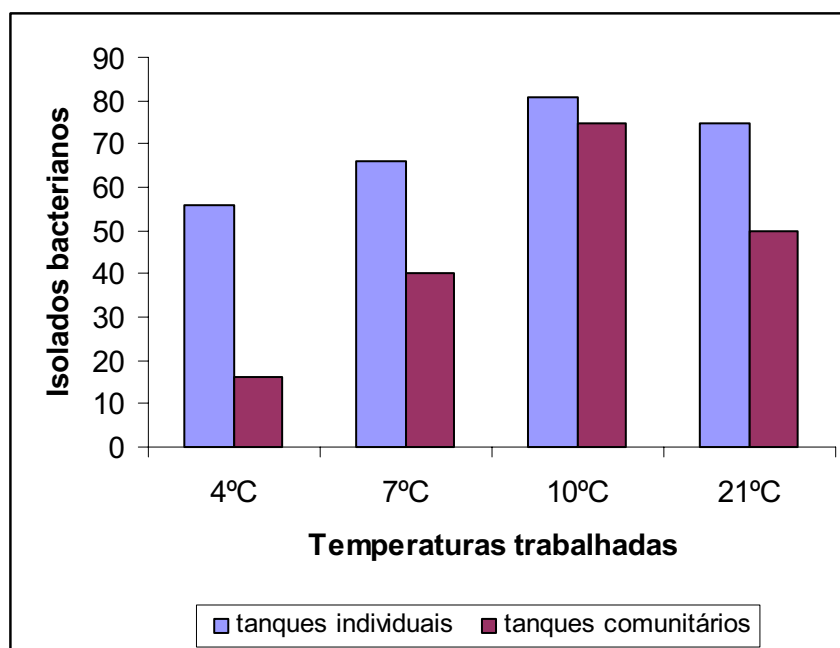
- 4% foram proteolíticas e lipolíticas a 7°, 10° e 21°C;
- 6,4% foram proteolíticas e lipolíticas a 10° e 21°C e também lipolítica a 4° e 7°C;
- 4% foram proteolíticas e lipolíticas a 7°, 10° e 21°C e também lipolítica a 4°C;
- 1,6% foram proteolíticas e lipolíticas a 7°C e também lipolítica a 4°, 10° e 21°C;
- 1,2% lipolíticas somente a 21°C;
- 1,2% lipolíticas a 4° e 7°C.

Tabela 6.3 - Avaliação das bactérias Gram negativas quanto a sua atividade enzimática nos tanques comunitários, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Gênero / N° de isolados	N° de amostras Total = 250							
	Tanques comunitários (121 isolados)							
	Proteólise				Lipólise			
	4°C	7°C	10°C	21°C	4°C	7°C	10°C	21°C
Não identificada (2)				1	2	2	2	2
<i>A hydrophila</i> (14)	1	10	14	14	6	4	4	4
<i>A sóbria</i> (1)	-	-	1	1	-	-	1	1
<i>Aeromonas spp</i> (4)	-	1	4	4	2	13	12	13
<i>Acinetobacter spp</i> (24)	-	4	4	1	23	23	18	23
<i>Alcaligenes faecalis</i> (1)	-	-	-	-	1	1	1	1
<i>C. luteola</i> (2)	1	1	1	1	2	2	2	1
<i>Ewingella americana</i> (7)	-	-	6	1	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i> (7)	-	-	7	-	-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i> (9)	-	3	9	3	-	1	1	1
<i>Klebsiella spp.</i> (1)	-	1	1	1	-	1		1
<i>P. fluorescens</i> (29)	13	15	20	29	29	30	26	24
<i>Pantoea spp</i> (15)	-	-	8	1	-	-	5	3
<i>Pseudomonas spp</i> (1)	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Serratia spp</i> (3)	-	-	2	1	-	-	2	1
<i>Sphmon. Paucomobilis</i> (1)	-	-	-	-	-	1	1	-

### 6.3.3.1 Crescimento da colônia e atividade proteolítica

A **Figura 6.3.** mostra a distribuição dos isolados proteolíticos encontradas em tanques individuais e comunitários. Observa-se que nos tanques individuais a 4, 7 e 21°C o número de isolados com atividade proteolítica foi maior que nos tanques comunitários, no entanto a 10°C os números se igualam. Nota-se também que a temperatura influencia a atividade proteolítica destas bactérias.



**Figura 6.4.** Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto à atividade proteolítica das bactérias Gram-negativas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

A análise estatística do número de isolados proteolíticos encontrados em tanques individuais e comunitários (figura 6.4), utilizando-se o teste  $X^2$ , mostrou que houve diferença significativa entre os dois tanques na temperatura de 4° C. O resultado mostra a probabilidade de dependência entre o número de isolados bacterianos produtores de proteases e o tipo de tanque, onde a maior atividade proteolítica foi encontrada nos tanques individuais. Esse resultado pode ser relacionado com os resultados anteriores de identificação dos microrganismos em cada tanque, onde a *Pseudomonas* foi o predominante neste tipo de tanque.

Nas temperaturas de 7, 10 e 21°C apesar dos tanques individuais apresentarem um número maior de isolados produtores de protease (Figura 6.4), não houve diferença significativa entre os tanques. Vale ressaltar que a 10°C as bactérias apresentaram um maior potencial deteriorante. A atividade proteolítica é responsável por alterações no leite, entre elas, a geleificação (acidificação doce).

Uma análise mais detalhada do crescimento e a atividade proteolítica foram realizadas para *Pseudomonas fluorescens*. A escolha desta bactéria deve-se ao fato da mesma apresentar, nas temperaturas estudadas, maiores halos e, portanto, maior potencial deteriorador (**anexo 1**). Os resultados para cada temperatura são mostrados na **Tabela 6.4**.

Tabela 6.4 - Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Início do crescimento	Aparecimento do Halo	Tamanho do halo (cm)
4	4 – 5º dia	7 – 8º dia	1,7 - 2,5
7	3 – 4º dia	4º dia	1,8 - 3,0
10	3º dia	4º dia	4,0 – 6,0
21	1º dia	2 - 3º dia	0,5 – 2,1

Observa-se que com a diminuição da temperatura, o halo proteolítico tende a demorar mais a aparecer. A refrigeração realmente tem efeito marcante na velocidade das reações químicas e enzimáticas e no crescimento dos microrganismos. A refrigeração reduz a velocidade das reações químicas e enzimáticas em termos logarítmicos com a temperatura conforme a lei de Arrhenius, permitindo controlar a perda de qualidade dos alimentos decorrentes da atividade fisiológica ou de outras reações químicas; oxidação de lipídeos, degradação de pigmentos e vitaminas, desnaturação de proteínas, etc (ORDÓÑEZ *et al*, 2005). Porém, em se tratando de microrganismos psicotróficos, embora os tempos de geração desses microrganismos sejam relativamente longos, seu metabolismo é bastante ativo nas temperaturas de refrigeração.

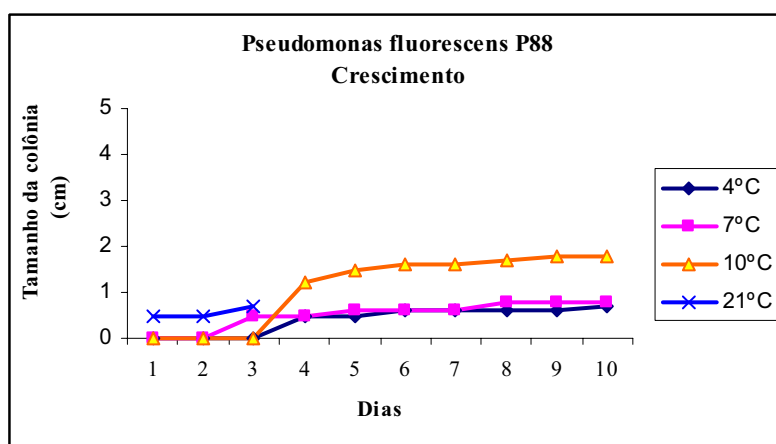
A **Figura 6.5** mostra o comportamento da *Pseudomonas fluorescens* P88 com relação ao crescimento (A) e a atividade proteolítica (B), nas temperaturas de 4, 7, 10 e 21°C. As outras estirpes apresentaram comportamento semelhante.

Novamente, a influência da temperatura pode ser observada. Com exceção da temperatura de 21°C, nota-se a presença da fase lag de crescimento, que dura por um período de aproximadamente de três dias.

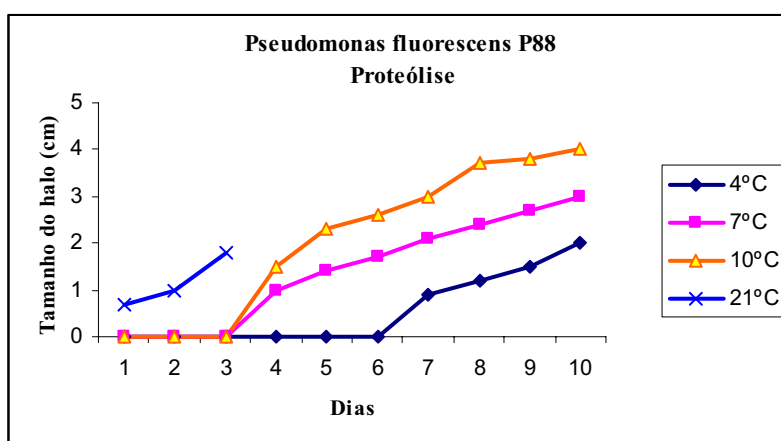
Ainda com referência à influência da temperatura, nota-se um aumento no crescimento e tamanho do halo com o aumento da temperatura, onde se observa maior valor para a temperatura de 10°C. Porém, como o tamanho do halo à 21°C foi determinado somente para os primeiros três dias, não se pode afirmar, com certeza, que o mesmo será superior ao observado para o de 10°C. Pode-se afirmar, no entanto, que existe uma tendência a esta afirmação se tornar realidade.

Neste estudo observou-se que para a temperatura de 4°C a produção enzimática foi mais pronunciada na fase estacionária de crescimento da bactéria, o que está de acordo com STEAD, (1987). Este autor cita que a maior produção de proteases ocorre normalmente

próxima à fase estacionária de crescimento bacteriano. No entanto para as temperaturas de 7°C, 10°C e 21°C, a produção de enzima foi associada ao crescimento da bactéria.



A



B

Figura 6.5 – Crescimento (A) e proteólise (B) da *Pseudomonas fluorescens* P88 nas temperaturas de 4, 7, 10 e 21°C

### 6.3.3.2 Crescimento e Atividade Lipolítica

De acordo com **Figura 6.6** o número de bactérias isoladas com atividade lipolítica alta ocorreu, principalmente, nos tanques individuais. Este fato pode ser explicado pela maior contaminação por bactérias psicrotróficas do gênero *Pseudomonas* nos tanques individuais que nos tanques comunitários. Quando se compara o resultado da atividade lipolítica com os da atividade proteolítica (**Figura 6.4**) observa-se que a primeira é bem mais pronunciada. Ao contrário da atividade proteolítica, a atividade lipolítica parece não ser influenciada pela temperatura.

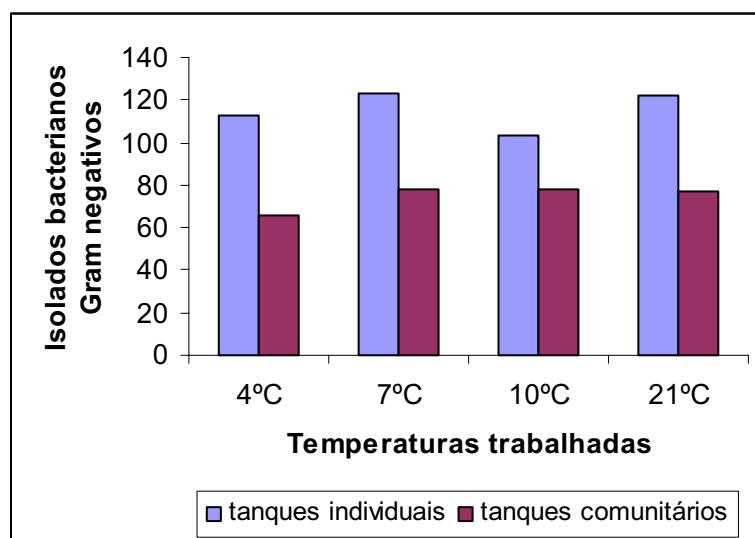


Figura 6.6. Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto a atividade lipolítica das bactérias Gram negativas incubadas a 4, 7, 10 e 21°C.

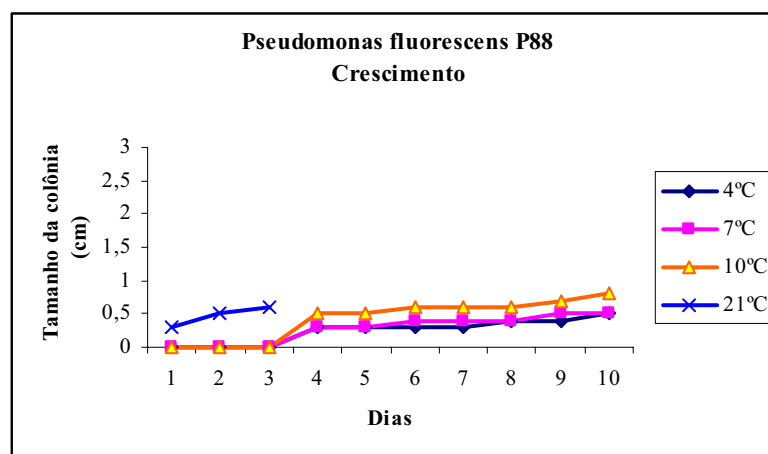
A análise estatística do número de isolados lipolíticos encontrados em tanques individuais e comunitários (Figura 6.6), utilizando-se o teste  $X^2$ , mostrou que houve diferença significativa entre os dois tanques nas temperaturas de 4, 7 e 21°C. De maneira semelhante aos isolados proteolíticos o resultado mostra a dependência entre o número de isolados bacterianos produtores de lipases e o tipo de tanque, onde a maior atividade lipolítica foi encontrada nos tanques individuais. Esse resultado pode também ser relacionado com os resultados anteriores de identificação dos microrganismos em cada tanque, onde o gênero *Pseudomonas* foi o predominante neste tipo de tanque. Na temperatura de 10°C não houve diferença significativa entre os tipos de tanques. A atividade lipolítica é responsável pela alteração do sabor e o ranço no leite e seus derivados.

Analisando-se o crescimento e a atividade lipolítica das *Pseudomonas fluorescens* que apresentaram os maiores halos (**anexo 2**), nas temperaturas estudadas, pode se observar que a temperatura realmente parece não ter muita influência sobre a atividade lipolítica. Com a diminuição da temperatura, o halo lipolítico tende a levar o mesmo tempo para aparecer (**TABELA 6.5**). Segundo COUSIN (1982) as lipases apresentam atividade ótima numa ampla faixa de temperatura (22-70 °C), as lipases produzidas por *Pseudomonas fluorescens* são ativas a temperatura de refrigeração (4-7°C), condizendo com os resultados apresentados.

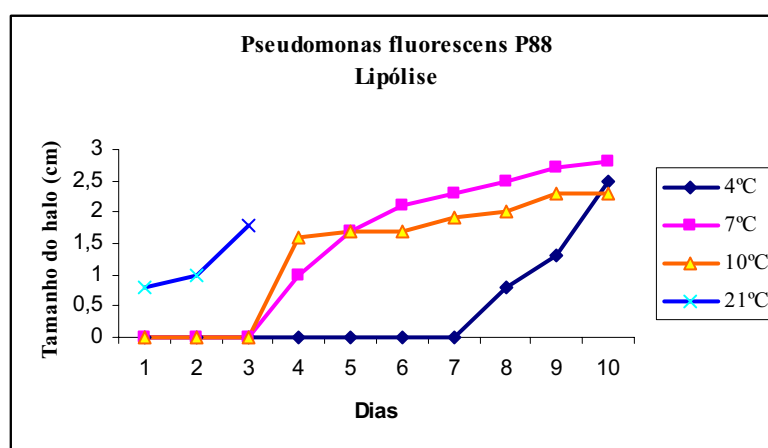
Tabela 6.5 - Atividade lipolítica da *Pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Início do crescimento	Aparecimento do Halo	Tamanho do halo (cm)
4	4 -5° dia	4 - 6 ° dia	1,7-2,7
7	3 – 4 – 5° dia	4° dia	1,8-3,0
10	3° dia	4° dia	≥ 3,0
21	1° dia	1-2° dia	0,2 a 2,5

A **Figura 6.7** mostra o comportamento da *Pseudomonas fluorescens* P88 com relação ao crescimento (A) e a atividade lipolítica (B), nas temperaturas de 4, 7, 10 e 21°C.



A



B

Figura 6.7 – Crescimento (A) e lipólise (B) da *pseudomonas fluorescens* P88 nas temperaturas de 4,7, 10 e 21°C.

O comportamento do crescimento e da produção enzimática da lipase foi semelhante ao observadas para as bactérias produtoras de proteases, ou seja, não foi observada a presença da fase lag para a temperatura de 21°C; a produção enzimática está associada ao crescimento,



com exceção da apresentada para a temperatura de 4°C. Neste caso, a maior produção de lipase ocorreu durante a fase estacionária de crescimento.

#### 6.4 Isolados Gram positivos

A identificação em nível de espécie foi considerada quando o programa APILAB indicou identidade  $\geq 80,0\%$  ou “boa identificação para gênero” e com a utilização de chaves de identificação para interpretação dos testes bioquímicos (BARROW, 1995) conforme a

#### Tabela.6.6.

Tabela 6.6. – Identificação Gram positivas isoladas nos tanques individuais e comunitários utilizando o sistema de identificação API e testes bioquímicos.

Gênero/Espécie	Nº Total de isolados = 59		% Identificação sistema API
	Tanques Individuais	Tanques Comunitários	
<i>Kurthia spp</i>	4	3	*
Levedura	1	0	*
<i>B. stearothermophilus</i>	0	1	*
<i>Bacillus coagulans</i>	0	1	99,2
<i>Bacillus lentus</i>	0	1	99,1 - 83,6
<i>Brevibacterium spp</i>	0	2	96,2
<i>Cellum/Microbacterium</i>	0	6	99,9
<i>Staphylococcus spp</i>	0	3	91,9 – 97,4
Não identificada	10	27	-
TOTAL	15	44	59

\*identificadas através dos testes bioquímicos complementares ao APILAB Plus v.3.3.3 (bioMérieux)

Neste estudo a maior contaminação ocorreu nos tanques comunitários, sendo os gêneros identificados predominantes *Bacillus* e *Microbacterium*. Este resultado está de acordo com os dados encontrados na literatura, nos quais as Gram positivas normalmente isoladas pertencem aos gêneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Arthrobacte* (MEER et al., 1991, 1993; COX, 1993; SHAH, 1994; SORHOUG e STEPANIAK, 1997; PINTO, 2004).

Os resultados desta pesquisa evidenciam a importância do grupo de microrganismos denominado termodúrico, que não é caracterizado pela temperatura de crescimento, mas sim pela sua resistência térmica, pois são capazes de sobreviverem ao tratamento térmico comumente utilizado na pasteurização do leite, ou seja, 72°C por 15 segundos ou 63°C por 30 minutos.

## 6.4.1 Atividade enzimática

A Avaliação das bactérias Gram positivas quanto a sua atividade enzimática nos tanques individuais e comunitários, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C são apresentadas nas **Tabelas 6.7 e 6.8.**

Tabela. 6.7 - Avaliação das bactérias Gram positivas quanto a sua atividade enzimática nos tanques individuais, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Gênero (nº de isolados)	Nº total de amostras = 59 (incluídos tanques comunitários e individuais)							
	Tanques individuais							
	Proteólise				Lipólise			
	4°C	7°C	10°C	21°C	4°C	7°C	10°C	21°C
Não identificado (10)	0	0	3	3	5	6	7	7
<i>Kurthia</i> (4)	0	0	0	0	0	0	0	0
Levedura (1)	0	0	0	0	1	1	1	1
TOTAL	0	0	3	3	6	7	8	8

De acordo com as **Tabelas 6.7 e 6.8** pode-se observar que as bactérias Gram positivas não identificadas foram as que expressaram uma maior atividade enzimática em todas as temperaturas estudadas. Nenhuma *Kurthia spp.* apresentou atividade enzimática, estando de acordo com o Manual de identificação BERGEY'S, 1994. Observa-se também que 30,51% foram proteolítica a 7°, 10 e 21°C e lipolítica a 10°C; 8,47% foram proteolíticos a 7°, 10° e 21°C; 8,47% foram lipolítica nas quatro temperaturas estudadas; 3,38% proteolíticos só a 21°C e somente um isolado tiveram atividade proteolítica a 4°C e seis atividade lipolítica a esta mesma temperatura. Baixas temperaturas parecem inibir a atividade enzimática, tendo em vista que apenas cinco estirpes apresentaram alguma atividade lipolítica a 4°C e nenhuma foi proteolítica a este tempo.

Por outro lado, a 10°C foi observada uma grande atividade para ambos os tipos de tanque, sobretudo para os comunitários. Estes resultados indicam que a nossa legislação deve ser revista e para melhor assegurar a qualidade do leite cru que é entregue a indústria.

Tabela 6.8. - Avaliação das bactérias Gram positivas quanto a sua atividade enzimática nos tanques comunitários, nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Gênero (nº de isolado de bactérias)	Nº total de amostras = 59 (incluídos tanques comunitários e individuais)							
	Tanques comunitários							
	Proteólise				Lipólise			
	4°C	7°C	10°C	21°C	4°C	7°C	10°C	21°C
<i>Bacillus coagulans</i> (1)	-	1	1	1	-	-	1	-
<i>Bacillus lentus</i> (2)	-	2	2	2	-	-	2	-
<i>Brevibacterium sp</i> (1)	1	1	1	1	-	-	1	-
<i>Cellum/Microbacterium</i> (6)	-	6	6	6	-	-	6	1
<i>B. stearothermophilus</i> (1)	-	-	1	-	-	-	1	-
<i>Staphylococcus sp</i> (3)	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Kurthia</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado (27)	-	19	26	24	-	1	13	1
TOTAL	1	29	38	34	0	1	24	2

As **Figuras 6.8 e 6.9** mostram a comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto às bactérias gram-positivas com atividade proteolítica e lipolítica, respectivamente, a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Conforme mostra a **Figura 6.8** uma grande do número de bactérias apresentou atividade proteolítica à 7°C, 10°C e 21°C, nos tanques comunitários. Segundo ORDÓÑEZ (2005) a refrigeração tem efeito marcante na velocidade das reações químicas e enzimáticas e no crescimento dos microrganismos. Os resultados aqui apresentados corroboram com este autor, tendo em vista nenhuma bactéria Gram positiva teve atividade proteolítica à 4°C em nenhum dos tanques. A alta atividade proteolítica nos tanques comunitários pode estar associada à diversidade de estirpes contaminantes.

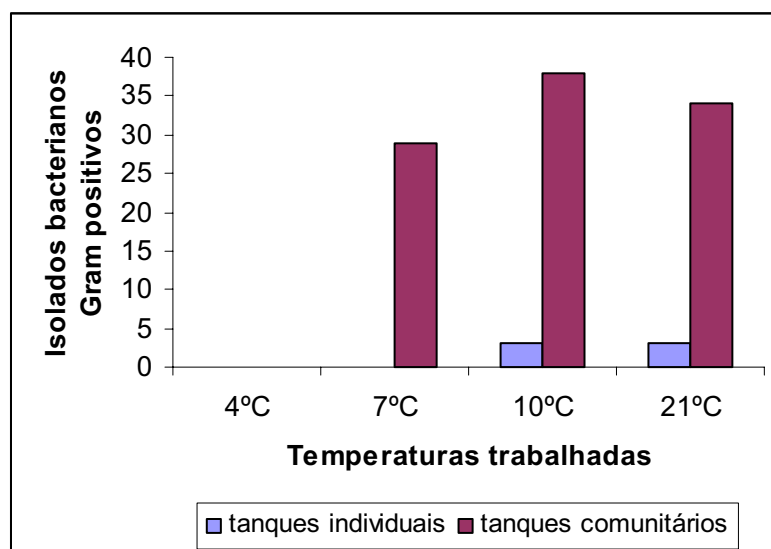


Figura 6.8. Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto à atividade proteolítica das bactérias Gram positivas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Nenhum dos isolados Gram positivos foram proteolíticas a 4°C durante 10 dias de incubação (figura 6.8).

Nas temperaturas de 7, 10 e 21°C a análise estatística do número de isolados proteolíticos encontrados em tanques individuais e comunitários, utilizando-se o teste  $X^2$ , mostrou que houve diferença significativa entre os dois tanques. A 10°C os isolados bacterianos dos tanques comunitários expressaram maior potencial proteolítico. Os resultados mostram a probabilidade de dependência entre a atividade enzimática (proteólise) e o tipo de microrganismo identificado, associado com o grau de contaminação do tipo de tanque utilizado. Na Figura 6.8 observa-se que nos tanques comunitários houve uma atividade proteolítica bastante expressiva, isto está coerente, pois neste tipo de tanque foi encontrada uma microbiota muito diversificada, com alguns *Bacillus* entre os gêneros identificados. No entanto, não foi possível identificar muitos isolados bacterianos que foram responsáveis por este potencial deteriorante mediante os testes empregados neste trabalho.

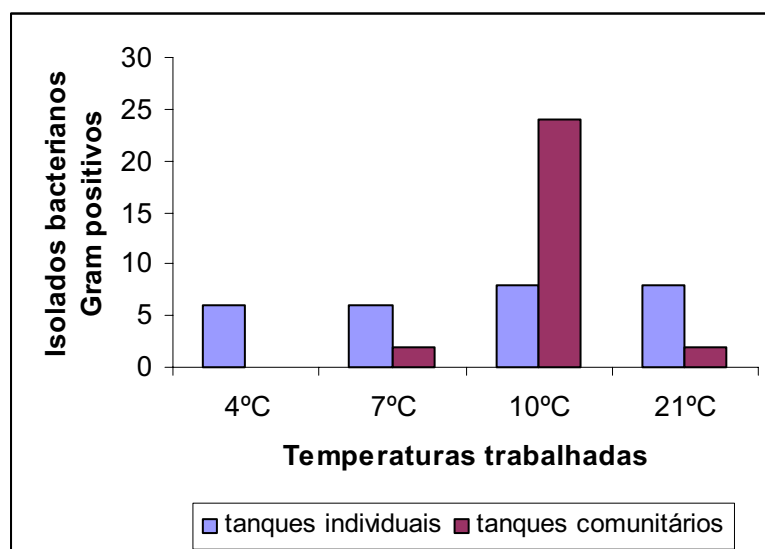


Figura 6.9. Comparação entre os tanques individuais e comunitários quanto à atividade lipolítica das bactérias Gram positivas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Nas temperaturas de 4, 7 e 21°C a análise estatística do número de isolados lipolíticos encontrados em tanques individuais e comunitários, utilizando-se o teste  $X^2$ , mostrou que não houve diferença significativa entre os dois tanques. No entanto, a 10°C houve diferença significativa, com os tanques comunitários apresentando uma atividade lipolítica bastante expressiva. Da mesma maneira que para os proteolíticos, os resultados mostram mais uma vez a probabilidade de dependência entre a atividade enzimática (lipólise) e o tipo de microrganismo identificado, associado com o grau de contaminação do tipo de tanque utilizado. Esta atividade enzimática é responsável pela alteração do sabor e o ranço no leite e seus derivados.

O número de isolados que apresentou atividade lipolítica nos tanques individuais foi aproximadamente a mesma em todas as temperaturas estudadas.

---

## **Capítulo 7: Conclusões e Sugestões**

---

## 7. Conclusões e Sugestões

### 7.1 – Conclusões

- Não foram constatadas diferenças significativas pelo teste  $X^2$  ( $P > 0,05$ ) entre as médias das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para o grupo psicrotrófico nas amostras de leite cru refrigerado, coletados em tanques individuais e comunitários;
- Foi observada uma maior diversidade dos gêneros de microrganismos encontrados em tanques comunitários comparando-se com os tanques individuais;
- A frequência de isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas Gram-negativas foi maior e dentre os isolados Gram-negativos identificados, o gênero *Pseudomonas* foi o mais freqüente (60,57%), especialmente a espécie *P. fluorescens*, que representou 37,6% dos identificados;
- Foi observado um grande potencial deteriorador na microbiota Gram-positiva e Gram negativa identificada, em função da capacidade de produzirem enzimas hidrolíticas e termoresistentes;
- Nas bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose, que inclui espécies do gênero *Pseudomonas*, foi constatada um maior percentual de isolados com atividades proteolítica e lipolítica, nas temperaturas avaliadas (4, 7, 10 e 21°C), evidenciando seu potencial deteriorador;
- Os resultados indicam a necessidade de treinamento, implementação e monitoramento em boas práticas agropecuárias e armazenamento do leite refrigerado de forma que a matéria-prima possa apresentar melhor qualidade e dessa forma minimizar os problemas tecnológicos associados à atividade enzimática de bactérias psicrotróficas contaminantes;
- Mesmo nas temperaturas de refrigeração de 4 e 7°C proposta pela legislação vigente, (BRASIL, 2002b), para a estocagem do leite na fonte de produção e no estabelecimento industrial, pode ocorrer à perda de qualidade da matéria-prima;
- A refrigeração do leite cru a 4°, além do tempo de armazenamento, é fator relevante para a conservação da qualidade do leite cru para a obtenção de produtos lácteos de alto padrão de qualidade.

- O banco de cultura de bactérias psicrotróficas formado neste trabalho poderá permitir outros estudos tais como estudos de proteases de psicrotróficos e ação sobre as proteínas do leite, estudos de fontes de contaminação das bactérias psicrotróficas predominantes no leite cru, desenvolvimento de método para detecção de bactérias psicrotróficas predominantes no leite por PCR "polymerase chain reaction", efeito de psicrotróficas no rendimento de queijos, capacidade de adesão de bactérias psicrotróficas a superfícies de aço inoxidável e borracha, eficiência de sanificantes na eliminação de bactérias psicrotróficas que predominam no leite cru aderidas a equipamentos de ordenha.

## **7.2 – Sugestões**

Como sugestão para aprimoramento desta pesquisa desenvolvida apontamos os seguintes tópicos:

- Avaliar a influência da temperatura na cinética de crescimento dos psicrotróficos;
- Modelar os dados obtidos através de modelos de microbiologia preditiva;
- Avaliar o efeito do desenvolvimento de bactérias psicrotróficas proteolíticas na hidrólise de proteínas do leite;
- Inocular as bactérias psicrotróficas com maior atividade proteolítica e lipolítica em leite pasteurizado utilizado para fabricação de queijos verificando os defeitos mais representativos e fazer um acompanhamento de vida de prateleira.
- Promover a capacitação técnica dos produtores de leite na Zona da Mata de Minas Gerais e sudeste do Rio de Janeiro, socializando conhecimentos e tecnologias que contribuam para viabilizar processos adequados de produção de leite com qualidade na propriedade leiteira;
- É preciso que as indústrias de laticínios sejam incentivadas, assessoradas e fiscalizadas de forma mais intensiva, para que adotem medidas preventivas e corretivas que sejam mais eficientes, tais como, os procedimentos prescritos pelas boas práticas de ordenha (gestão de produção leiteira com qualidade e segurança alimentar).



---

## **Capítulo 8: Referências Bibliográficas**

---

## 8. Referências Bibliográficas

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.58, n.6, p.828-834, Jun. 1975.

ADHIKARI, A. K.; SINGHAL, O. P. Effect of heat resistant micro-organisms on the fatty acid profile and the organoleptic quality of UHT milk during storage. **Journal of Dairy Science**, Indian, V.45, n.5, p.272-277, May. 1992.

ALMEIDA, A. A. P. Microrganismos psicrótroficos em leite e derivados. Rev. do ILCT, Anais de XV Congresso Nacional de Laticínios, v.53, p.90-93, n. 304, 1998.

ANDRADE, N.J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1454-1458, 1998.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrótroficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: Brito, J.R.F. ; Portugal, J.A.B. (ed). Diagnóstico da Qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. 1ªed., Juiz de Fora, Templo Gráfica e Editora Ltda, 2003, p.105 – 115.

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of Staphylococci and Micrococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, n.6, p. 875-879, 1984.

BARACH, J. T., ADAMS, D. M. & SPECK, M. L. **Journal of Dairy Science**. v.59, 391p.1976.

BARROW, G.L., FELTHAM, R.K.A. (ed.). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3ª ed., Cambridge University Press. 331p. 1995.

BEHMER, M. L. A, **Tecnologia do Leite (produção, industrialização e análise)**, 11ª edição, São Paulo, Ed. Nobel, 1981;

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Estimation of potencial shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. **Journal of Food Protection**, Ames, v.48, n.8, p.663-667, Aug. 1988.

BRAMLEY, A . J.; MCKINNON,C. H. Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk. 2.ed. London\Nem York: Elsevier Science Ltda, 1990. Cap.5: The microbiology of raw milk, p.163-207.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº51**. 48 p. Brasília, DF. 2002.

BRITO, J. R. F. & BRITO, M. A. V. P. Produção higiênica de leite. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v. 22, n. 211, 2001.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Produção de leite seguro e com garantia de qualidade. In: Vilela et al. (Ed.) O agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. Cap.30, p. 509-518.

BRITO, M.A.V.P. et al. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para produção de leite em bases sustentáveis. In: Carlos Eugênio Martins ... [et al.] (eds.). Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003 p. 21-34.

BRITO, M.A.V.P. Qualidade do leite a partir de detalhes. Balde Branco, Outubro, p. 66-74, 2001.

BRITO, M.A.V.P., Brito, J.R.F., Portugal, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do ILCT**, Anais do XIX Congresso Nacional de Laticínios, v.57, p.83-88, 2002.

BRUM, J. V. F., GONÇALVES, N. B. e MASSON, M. L. Pesquisa de microrganismos psicotróficos em leite cru produzido nos estados do Paraná e Santa Catarina. Rev. do ILCT, Anais de XXI Congresso Nacional de Laticínios, v.59, p.150-154, n. 339, 2004.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. Journal of Dairy Science, Baltimore, v.84, n.1, p.157-160, Jan.1981.

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

COX, J. M. The significance of psychrotrophic pseudomonads in dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.48, p.108-113, 1993.

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. **Journal of Dairy Technology**, Austratian, v.47, n.1, p.50-55, Jan.1993.

CUNHA, L. T.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Determinação das condições físico-químicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15, Poços de Caldas, 1996. Resumos.Lavras: UFLA, 1996. Cap.2, p.73.

DASSIE, C. Tanques comunitários. A força dos pequenos produtores. Balde Branco,n.427, p.44-50, 2000.

*Diário Oficial da União*, Brasília, 2002. 39p.

DOMMETT, T. W. Spoilage of aseptically packaged pasteurized liquid dairy products by thermoduric psychrotrophs. **Food Australia**, v.10, n.44, p.459-461, 1992.

DRUCE, R. G. & THOMAS, S. B. An ecological study of the psychrotrophic bacteria of soil, water, grass and hay. *Journal of Applied bacteriology*. v. 33, p. 420-435, 1970.

ENRIGUE, L.H. Enfriamiento y comercialización de leche fresca por pequeños productores. Panamerican Congress on mastitis control and milk quality, Merida: March 23-27, 1998: Proceedings, p. 267-270.

FACKLAM, R., and J. A. ELLIOT. **1995. Identification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin. Microbiol. Rev. 8:479-495, 1995.**

FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, n.1, p. 139-177, 1986.

FAJARDO-LIRA, C. E., NIELSEN, S. S. Effect of Psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk., **Journal of Dairy Science** v.81, n.4, p. 901-908, 1998.

FLORIANI, C. G. Café & leite. Caderno Técnico - IMA. Belo Horizonte, IMA – nº6, 44p, 2002.

FOSTER, E. M. et al. **Microbiologia de la leche**. México: Herrero, 1965.

FRANK, J.F., CHRISTEN, G.L., BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In *Standard Methods for the Examination of Dairy products*, Marshall, R.T. (ed.). 16<sup>a</sup> edição, American Public Health Association, Washigton, DC. p.271-286, 1992.

GARG, S.K. Psychrotrophs in milk – review. **Indian Journal Dairy Science**, n.43, v.3, p.433-440, 1990.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. Piracicaba: ESALQ, 1988. 85p. (Tese – Mestrado em Tecnologia de Alimentos).

INGRAHAM, J. L.; STOKES, J. L. **Psychrophilic bacteria**. *Bacteriol.* v.23, 97-108, 1959.  
INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk. Enumeration of somatic cell. Brussels: IDF / FIL, 1995 (IDF Standard 148 A) 8p.

JASPE, A.; MATIAS, P.; FERNANDEZ, L.; SAN JOSE, C. Revision: Interacciones entre la flora láctica y la flora psicrotrofa Gram-negativa de la leche. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.33, n.5, p.461-467, 1993.

JAYARAO, B.M.; WANG, L. A study on the prevalence of Gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal Dairy Science**, v.88, p.2620-2624, 1999.

KOHLMANN, K.L. et al. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3275-3283, 1991.

KRAFT, A. A.; REY, C. R. Psychrotrophic bacteria in foods: an update. **Food Technology**, Chicago, v. 33, n. 1, p. 66-71, 1979.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981.

LAW, B.A. Reviews of the progress of Dairy Science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 3, p. 573-588, 1979.

MAHARI, T. & GASHE, B. A. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the sources of contamination in milk processing plant in Addis Ababa, Ethiopia. *Journal of Dairy Research*, v.57, p.233-238, 1990.

MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. Jr. Textbook of diagnostic microbiology; Sauders Co., Philadelphia, 1997.

MEER, R.R., BAKER, J., BODYFELT, F.W., and GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic Bacillus spp. in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection**, v.54, p.969-979, 1991.

MENDONÇA, A . H., CERQUEIRA, M.M.OP., SOUZA, M.R., PENNA, C.F.A.M., SIQUEIRA, T.M.L., CAMARGOS, C.R.M. Qualidade microbiológica de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. Rev. do ILCT, Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios, v.56, p.282-288, 2001.

MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington D.C., v. 39, n. 2, p. 145-167, 1975.

MOSTELLER, T. M., BISHOP, J. R., Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

MOURA, C. J. ; ABREU, L. R. ; FURTADO, M. M. ; ROSSI, D. A. ; CARVALHO, E. P.; PINTO, S. M. . Lipólise e Avaliação Sensorial em Queijo Tipo Parmesão Fabricado com Leite Resfriado e Inoculado Com Pseudomonas Fluorescens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 3-8, 1999.

MOURA, C. J. ; ABREU, L. R. ; FURTADO, M. M. ; ROSSI, D. A. ; CARVALHO, E. P.; PINTO, S. M. . Efeito do Resfriamento e Inoculação de Pseudomonas Fluorescens Sobre a Proteólise e Lipólise do Leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, p. 17-13, 1999.

MUIR, D. D. The fresh-life of Dairy Products: 1. Factores influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MUIR, D. D. The microbiology of heat-treated fluid milk products. **Dairy Microbiology: The microbiology of milk**. 2.ed. London/New York: Elsevier Science Ltda. Cap.6, p.209-243, 1990.

MUTUKUMIRA, A. N.; FERESU, S. B.; NARVHUS, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.9, p.984-987, Sept. 1996.

ORDÓÑEZ, J.; *et al* Tecnologia de Alimentos. vol.2. Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279p.

ORDÓÑEZ, J.; *et al*. Tecnologia de Alimentos. vol.1. Componentes dos Alimentos e Processos. Porto alegre: Artmed, 2005. 294p.

PALMER, J. Contamination of milk from the milking equipment. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. V.33, p.307-316, 1981.

PHILLIPS, D. M. P. e JOHNS, E. W. A study of the proteinase content and the chromatography of thymus histones. **Biochem J**. Jul; 72:538-44, 1959.

PINTO, C. L. O. de, CARDOSO, R. R. e VANETTI, M. C. D. As psicrotróficas proteolíticas e potencial deteriorador a temperaturas de refrigeração. Rev. do ILCT, Anais de XXI Congresso Nacional de Laticínios, v.59, p.110-117, n. 339, 2004.

PINTO, C. L. O.; LOPES, M. M.; MORAES, C. A.; VANETTI, M. C. D. Potencial deteriorador de bactérias Psicrotróficas Gram-negativas isoladas de amostras de leite cru refrigerado. **Revista do ILCT**, Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios, v.58, p.49-54, 2003.

PINTO, U. M., PINTO, C. L. O. de, COSTA, E. D., IASBIK, A. F., SAMPAIO, A.H.D., AMORIM, B. L., WELLAREO, E. D. M. Boas práticas de armazenamento de leite cru em tanques de refrigeração localizados no município de Viçosa, MG, Brasil.. Rev. do ILCT, Anais de XXI Congresso Nacional de Laticínios, v.59, p.211-214, n. 339, 2004.



QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby, 1999. 648 p.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual - Bactérias e Fungos**. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 3-10 e 41-68.

ROBINSON, R. K. **Microbiologia de la leche**. Espanha: Acríbia, 1987, v.1. 230p.

ROWE, M. T. & GILMOUR, A. In: Dairy Microbiology. Elsevier Applied Science. v.1, London, p.37-75, 1990.

SANNABHADTI, S.S. Hygienic aspects of milk production. In: International Dairy Federation Workshop on Small Scale Dairy Processing and Indigenous Milk Products. International Dairy Federation, Anand, Dezembro, 4 a 6, 1997. p. 100-110.

SANTANA, E.H.W; BELOTI, V.; BARROS, M. Microrganismos psicotróficos em leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 27-33, 2001.

SANTOS, J.A. Em busca de viabilizar a pequena produção familiar. Indústria de laticínios, ano 4, n.22, Jul/Ago, p. 20-24, 1999.

SANTOS, M. V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Disponível em: <[www.milkpoint.com.br/mn/radarestecnicos](http://www.milkpoint.com.br/mn/radarestecnicos)>. Acessoem: 26 mar. 2003.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p.432-437, 1994.

SILVEIRA, I. A. et al. Influência de microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

SLAGHUIS, B. Sources and significance of contaminants on different levels of raw milk production. In: SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. Proceedings... Brussels: International Dairy Federation, 1996. p. 19-27.

SMILTWELL, N. & KAILASAPATHY, K. Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk: problems with shelf life. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, p.28-31, maio, 1995.

SØRHOUG, T., STEPANIAK, L. **Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects.** **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.8, p. 35-41, 1997.

SOUZA, M.R., Cerqueira, M.M.O.P., Sena, M.J., Leite, M.O., Morais, C.F.A. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. Rev. do ILCT, Anais di XVI Congresso Nacional de Laticínios, v.54, p.238-241, 1999.

STADHOUDERS, J. Microbes in milk and dairy products. Na ecological approach. Neth. **Journal Milk Dairy**. V.29, p.104-126, 1975.

STONE, L.S. & ZOTTOLA, E.A. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. **Journal Food Science**. v. 50, n. 4, p. 951-956, 1985.

SUMNER, J. Farm production influences on milk hygiene quality. In: SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. Proceedings... Brussels: International Dairy Federation, 1996.p. 94-102.

TERNSTRON, A; LINDBERG, A.M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied bacteriology**, Reading, v.75, p.25-34, Jan.1993.

THOMAS, S.B. Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. Part I. **Dairy Industries**, v.20, p. 355-370, 1958.

THOMAS, S.B.; DRUCE, R. G. and DAVIES, A. The significance of psychrotrophic bacteria in raw milk. **Dairy Industries**, v.31, p. 27-32, 1966.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk – Part 1. **Dairy Industries**, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973a.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk – Part 2. **Dairy Industries**, v. 38, n. 2, p. 61-70, 1973b.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. The bacterial content of farm bulk milk tanks. **Dairy Industries**, v.41, p. 162-164, 1976.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. The bacterial content of milking machines and pipeline milking plants. A review. **Dairy Industries**, v.42, p. 7-12, 1977.

VON BOCKELMANN, I. Contamination – importance of water residues in milking equipment. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. V.33. p. 325-327, 1981.

WASHAM, C. J.; OLSON, H. C.; VEDAMUTHU, E. R. Heat resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. **Journal of Food Protection**. V.40, p.101-108, 1977.

ZADON, J. G. UHT Milk – Standards and Quality Assurance. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v.35. p140-144. Dec.1980.

---

## **ANEXOS**

---

# Anexo 1

Temperatura = 4°C

## Proteólise

### Crescimento

	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Pseudomonas fluorescens	P67			0,3	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P69			0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens	P88			0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P89			0,5	0,7	0,9	0,9	1	1	1
Pseudomonas fluorescens	P226				0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P227				0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P228				0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P229				0,5	0,5	0,7	0,7	0,7	0,7
Pseudomonas fluorescens	P232				0,3	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P246				0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8
Pseudomonas fluorescens	P250				0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P253				0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P278			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
Pseudomonas fluorescens	P294			0,3	0,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8
Pseudomonas fluorescens	P316				0,3	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P317				0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P318				0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P169				0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P230			0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P231				0,2	0,3	0,5	0,7	0,7	0,7
Pseudomonas fluorescens	P271			0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P275			0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7
Pseudomonas fluorescens	P276			0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P280			0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P281			0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6

### Halo

	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
P67					0,5	0,6	0,8	1,2	1,5	1,8
P69							0,6	0,9	1,3	1,7
P88							0,9	1,2	1,5	2
P89							1,2	1,5	1,7	2,1
P226							0,8	1	1,6	1,8
P227							1,1	1,5	1,7	2
P228							0,9	1	1,7	2
P229							0,9	1	1,6	1,9
P232							0,6	1	1,3	1,8
P246							1,2	1,5	1,7	2,2
P250							0,9	1,3	1,8	2,1
P253							0,8	0,9	1,3	1,8
P278							0,5	0,8	1	1,7
P294							1,1	1,3	1,7	2,2
P316							0,9	1	1,6	1,9
P317							0,7	1	1,6	1,6
P318							1	1,3	1,5	2
P169								0,7	1,3	1,7
P230								0,9	1,7	2
P231								1	1,7	2,1
P271								1,1	1,5	1,9
P275								0,8	1,3	1,7
P276								0,9	1,3	1,8
P280								0,7	1	1,7
P281								1	1,5	1,8

Pseudomonas fluorescens	P289					0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7										0,8	1,3	1,7	
Pseudomonas fluorescens	P291					0,2	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8											0,9	1,3	1,8
Pseudomonas fluorescens	P73					0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7									0,8	1,1	1,4	1,7	2,2
Pseudomonas fluorescens	P74					0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8									0,8	1	1,3	1,8	2
Pseudomonas fluorescens	P75					0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7									0,7	1	1,3	1,5	1,8
Pseudomonas fluorescens	P287					0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8													1,7
Pseudomonas fluorescens	P309					0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8														1,9

**Temperatura = 7°C**

**Proteólise**

**Halo**

		<b>Crescimento</b>										<b>Halo</b>									
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
Pseudomonas fluorescens	P67				0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9				0,8	1	1,7	2,1	2,4	2,7	2,8
Pseudomonas fluorescens	P73				0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	1	1				1	1,2	1,8	2,2	2,5	2,7	3
Pseudomonas fluorescens	P74				0,4	0,4	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8				0,6	1	1,4	1,7	1,7	2,1	2,3
Pseudomonas fluorescens	P75				0,4	0,4	0,6	0,6	0,8	0,8	0,9				0,6	1	1,4	1,7	1,9	2,2	2,5
Pseudomonas fluorescens	P85				0,5	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9				0,6	1	1,7	2	2,4	2,5	3
Pseudomonas fluorescens	P86				0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8				0,6	1	1,5	1,9	2,2	2,7	2,7
<b>Pseudomonas fluorescens</b>	<b>P88</b>				0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8				<b>1</b>	<b>1,4</b>	<b>1,7</b>	<b>2,1</b>	<b>2,4</b>	<b>2,7</b>	<b>3</b>
Pseudomonas fluorescens	P89				0,5	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8				1	1,4	1,7	2,1	2,4	2,7	3
Pseudomonas fluorescens	P225	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6				0,5	1	1,3	1,6	1,9	2	2,3
Pseudomonas fluorescens	P227	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6				0,6	0,9	1,2	1,6	1,8	2	2,2
Pseudomonas fluorescens	P228	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8				0,4	0,6	1	1,4	1,5	1,7	1,9
Pseudomonas fluorescens	P229	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5				0,5	0,9	1,2	1,6	1,8	2	2,2
Pseudomonas fluorescens	P246				0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8				0,2	0,5	1,2	1,3	1,6	1,7	2
Pseudomonas fluorescens	P249				0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9				0,2	0,6	1,1	1,1	1,4	1,5	1,8
Pseudomonas fluorescens	P250				0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7				0,4	0,9	1,1	1,4	1,5	1,9	2
Pseudomonas fluorescens	P275	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8				0,2	0,4	0,8	1,1	1,4	1,5	1,8
Pseudomonas fluorescens	P276				0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6				0,4	0,5	0,8	1	1,4	1,5	1,8
Pseudomonas fluorescens	P278	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7				0,2	0,5	0,8	1	1,4	1,5	1,8
Pseudomonas fluorescens	P286				0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6				0,1	0,5	0,8	1,2	1,4	1,5	1,8

	P294		0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	P294
Pseudomonas fluorescens	P294		0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	P294
Pseudomonas fluorescens	P309		0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	P309
Pseudomonas fluorescens	P316	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	P316
Pseudomonas fluorescens	P317	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	P317
Pseudomonas fluorescens	P318	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	P318
Pseudomonas fluorescens	P69			0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	P69
Pseudomonas fluorescens	P173		0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	P173
Pseudomonas fluorescens	P285		0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	P285
Pseudomonas fluorescens	P148						0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	P148

**Temperatura = 10°C**

**Proteólise**

**Halo**

	Crescimento										Halo											
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°		
Pseudomonas fluorescens	P75							2,2	2,2	3												
Pseudomonas fluorescens	P78				1,2	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4										
Pseudomonas fluorescens	P85				1,5	2,1	2,1	2,1	2,4	2,4	2,5											
Pseudomonas fluorescens	P86				0,5	0,8	0,9	1	1	1,1	1,1											
<b>Pseudomonas fluorescens</b>	<b>P88</b>				<b>1,2</b>	<b>1,5</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>1,7</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>											
Pseudomonas fluorescens	P89				1	1	1	1	1,2	1,2	1,3											
Pseudomonas fluorescens	P169				0,6	2,5	2,7	2,8	2,8	2,9	3											
Pseudomonas fluorescens	P227				0,7	1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,5											
Pseudomonas fluorescens	P253				0,7	1	1,1	1,3	1,2	1,2	1,5											
Pseudomonas fluorescens	P263				0,8	1,1	1,2	1,3	1,4	1,4	1,5											
Pseudomonas fluorescens	P286				1	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7											
Pseudomonas fluorescens	P287				1,2	1,6	1,6	1,6	1,7	1,9	2											
Pseudomonas fluorescens	P281				0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9	1											
Pseudomonas fluorescens	P288				1,2	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6											
Pseudomonas fluorescens	P298				1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	1,8	2											
Pseudomonas fluorescens	P303				2,4	2,4	2,4	2,4	2,5	2,6	2,6											
Pseudomonas fluorescens	P310				1	1,4	1,4	2	2,2	2,5	3											
Pseudomonas fluorescens	P316				1	2	2	2	2	2,4	2,5											

Pseudomonas fluorescens	P319		1,4	1,9	2,2	2,2	3	3,5	3,7	4	P319			2,1	2,5	2,5	3,5	4	4,5	5,1	
Pseudomonas fluorescens	P323		1,1	3,2	3,2	3,2	3,5	3,6	3,7	3,7	P323			3,5	3,6	4	4,5	4,6	4,8	5	
Pseudomonas fluorescens	P325		0,7	3,2	3,2	3,2	3,5	3,6	3,7	3,7	P325			3,5	3,6	4	4,5	4,6	4,8	5	
Pseudomonas fluorescens	P175			4,2	4,3	4,3	4,3	4,3	4,4	4,4	P175			4,8	5	5	5,3	5,4	6		
Pseudomonas fluorescens	P229		0,6	0,9	1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	P229		0,8	2	2,3	2,6	3	3,6	3,9	4	
Pseudomonas fluorescens	P231		0,6	0,9	0,9	1	1,1	1,1	1,1	1,1	P231		0,7	2,3	2,6	2,6	2,9	3,5	4	4	
Pseudomonas fluorescens	P232		0,5	0,9	1	1	1,1	1,1	1,4	1,4	P232		0,7	1,9	2,2	2,5	3	3,5	3,9	4	
Pseudomonas fluorescens	P278		0,4	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	P278		0,6	1,8	2,2	2,3	3	3,4	3,6	4	
Pseudomonas fluorescens	P280		0,7	0,8	0,9	0,9	1	1,1	1,1	1,4	P280		1	2	2,5	2,6	3,2	3,6	3,7	4	
Pseudomonas fluorescens	P289		0,8	1	1,1	1,1	1,1	1,3	1,4	1,4	P289		1	2	2,4	2,7	3,1	3,7	3,8	4,1	
Pseudomonas fluorescens	P317	2	2,7	3	3,1	3,3	3,5	3,7	4	5,3	P317	2,7	3	3,5	3,8	4,1	4,3	4,6	5	5,3	6
Pseudomonas fluorescens	P318	2	2,7	3	3,1	3,3	3,5	3,7	4	5,3	P318	2,7	3	3,5	3,8	4,1	4,3	4,6	5	5,3	6

**Proteólise 21°C**

**Crescimento**

**Halo**

Isolado	24h	48h	72h	Halo			24h	48h	72h
P67	0,5	0,6	0,8				0,6	1,5	2,1
P68	0,4	0,7	0,8				0	0,9	1,4
P69	0,5	0,7	0,8				0	1	1,5
P70	0,4	0,6	0,8				0	0	1,1
P71	0,5	0,6	0,7				0	0,8	1,3
P72	0,4	0,6	0,7				0	0,9	1,4
P73	0,8	0,9	1,1				0	1,5	2,1
P74	0,6	0,8	1				0	1,5	2
P75	0,4	0,6	0,7				0	1,2	1,7
P78	0,4	0,5	0,6				0	1	1,3
P85	0,4	0,5	0,7				0	1,2	1,8
P86	0,3	0,5	0,7				0,5	1,3	1,9
P88	0,5	0,5	0,7				0,7	1	1,8
P89	0,4	0,4	0,6				0,6	1	1,8



P147		0,6	0,7	0,8	P147		0	1	1,9
P148		0,6	0,7	0,7	P148		0	1	1,7
P169		0,4	0,5	0,6	P169		0,3	0,7	0,8
P173		0,3	0,5	0,7	P173		0	0,4	0,8
P175		0,8	1	1,1	P175		0	0,7	1,2
P225		0,3	0,4	0,5	P225		0	0,2	0,5
P226		0,5	0,7	0,8	P226		0,2	0,8	1,3
P227		0,6	0,8	0,9	P227		0,5	0,9	1,4
P228		0,7	0,9	1	P228		0,3	0,9	1,3
P229		0,5	0,7	0,8	P229		0,3	0,8	1,4
P230		0,2	0,4	0,5	P230		0,2	0,7	1,2
P231		0,3	0,5	0,7	P231		0,3	0,7	1,1
P232		0,3	0,5	0,6	P232		0,2	0,7	1,2
P239		0,4	0,6	0,7	P239		0	0,3	0,7
P240		0,5	0,7	0,8	P240		0	0,3	0,7
P241		0,4	0,6	0,6	P241		0	0,2	0,7
P242		0,4	0,5	0,7	P242		0	0,3	0,5
P243		0,6	0,8	0,9	P243		0,1	0,6	0,8
P244		0,6	0,7	0,9	P244		0	0,6	0,9
P245		0,6	0,8	0,9	P245		0,2	1	1,1
P246		0,6	0,8	0,9	P246		0,2	0,9	1,5
P247		0,5	0,7	0,8	P247		0,2	0,6	1,1
P248		0,6	0,7	0,8	P248		0,2	0,8	1,4
P249		0,5	0,6	0,7	P249		0,1	0,7	1,3
P250		0,4	0,5	0,6	P250		0,2	0,9	1,4
P251		0,4	0,6	0,7	P251		0	0,4	0,6
P252		0,6	0,6	0,8	P252		0	0,6	1
P253		0,4	0,5	0,6	P253		0	0,3	0,8
P254		0,5	0,7	0,9	P254		0	0,3	0,6
P255		0,4	0,5	0,9	P255		0	0,3	0,6
P256		0,4	0,4	0,7	P256		0	0,5	1
P257		0,5	0,6	0,7	P257		0	0,7	1,3
P258		0,3	0,4	0,6	P258		0	0	0,5

P260		0,5	0,6	0,8		P260		0	0,6	1,1
P263		0,5	0,7	0,8		P263		0	0,6	1
P271		0,4	0,5	0,7		P271		0,2	0,8	1,3
P274		0,4	0,6	0,6		P274		0	0,4	0,9
P275		0,6	0,7	1		P275		0	0,7	1
P276		0,3	0,5	0,6		P276		0	0,6	1,1
P278		0,4	0,5	0,6		P278		0	0,8	1,2
P280		0,6	0,7	0,8		P280		0	0,6	1,1
P281		0,3	0,4	0,5		P281		0	0,6	1
P282		0,6	0,7	0,9		P282		0	0,7	1,1
P283		0,7	0,9	1,3		P283		0	0,6	1,2
P285		0,2	0,5	0,6		P285		0	0,3	0,4
P286		0,4	0,6	0,6		P286		0,3	0,8	1,3
P287		0,5	0,7	0,8		P287		0	0,6	0,8
P288		0,4	0,8	0,8		P288		0	0,6	0,7
P289		0,5	0,7	0,8		P289		0,1	1,1	1,2
P290		0,5	0,6	0,8		P290		0,2	0,9	1,1
P291		0,4	0,5	0,8		P291		0,1	1	1,2
P293		0,4	0,7	0,7		P293		0,1	0,6	0,8
P294		0,7	0,8	0,9		P294		0,3	1	1,3
P295		0,3	0,5	0,5		P295		0	0,5	0,8
P297		0,6	0,8	0,9		P297		0	0,1	0,1
P298		0,4	0,7	0,7		P298		0,2	0,9	1,2
P300		0,3	0,6	0,7		P300		0	0,1	0,2
P301		0,4	0,8	0,8		P301		0	0,1	0,6
P302		0,4	0,5	0,6		P302		0	0,5	0,8
P303		0,5	0,8	0,8		P303		0	0,7	0,7
P307		0,6	0,7	0,9		P307		0	1	1,1
P309		0,3	0,4	0,6		P309		0	0,5	0,9
P310		1,5	1,5	1,5		P310		0,1	0,4	0,8
P316		0,4	0,5	0,6		P316		0,4	0,8	1,4
P317		0,4	0,5	0,6		P317		0,4	0,8	1,2
P318		0,8	0,8	1		P318		0,2	0,8	1,3

P319	0,4	0,6	0,7	P319	0	0,6
P323	0	0,6	0,7	P323	0	0,9
P325	0,7	0,7	0,9	P325	0	0,3

## Anexo 2

Temperatura = 4°C (Halo de  $\geq 1,7-2,7$ )

### Lipolítica

### Crescimento

	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Pseudomonas fluorescens P67				0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens P69				0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens P70					0,5	0,5	0,6	0,6	0,8	0,8
Pseudomonas fluorescens P71					0,4	0,4	0,5	0,6	0,7	0,9
Pseudomonas fluorescens P85					0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens P89				0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens P246					0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens P283				0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
Pseudomonas fluorescens P289				0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens P290				0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens P309					0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens P239				0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
Pseudomonas fluorescens P240				0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens P241				0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens P242				0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens P72				0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,7
Pseudomonas fluorescens P248					0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens P250					0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens P251				0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
Pseudomonas fluorescens P254					0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
Pseudomonas fluorescens P260					0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5

### Halo

	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
P67					1	1,2	1,5	1,8	1,8	2,4
P69					1	1,4	1,5	1,7	1,7	2,4
P70					1,2	1,2	1,5	2	2,3	2,5
P71					0,9	0,9	1,3	1,6	2	2,4
P85					1,4	1,4	1,7	2	2,1	2,5
P89					0,5	0,8	1,4	2	2	2,7
P246					0,6	1	1	1	1	1,7
P283					0,5	0,7	0,9	1,3	1,3	1,8
P289					1	1,2	1,5	1,7	1,7	2,5
P290					0,8	1	1,3	1,5	1,5	2,2
P309					0,5	1,1	1,5	1,5	1,5	2,2
P239						0,5	0,5	1,7	1,9	2
P240						0,4	0,4	1,5	1,8	2
P241						0,7	0,7	1,8	2	2,1
P242						0,5	0,5	1,7	1,8	2,1
P72						0,7	1,4	1,7	1,7	2,3
P248						0,5	0,9	0,9	0,9	2
P250						0,7	1,4	1,8	2,2	2,5
P251						0,5	0,5	1,7	2	2,1
P254						0,8	0,8	0,8	0,8	1,9
P260						0,9	1,3	1,3	1,3	2,2

Pseudomonas fluorescens	P263						0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P267		0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,7	0,7	0,7	1,2	1,9
Pseudomonas fluorescens	P274		0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	1,4	1,4	2
Pseudomonas fluorescens	P275		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	1,7	1,7	2,2
Pseudomonas fluorescens	P280		0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	1,1	1,1	2,1
Pseudomonas fluorescens	P285			0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	1	1	1,7
Pseudomonas fluorescens	P287		0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	1,1	1,1	1,9
Pseudomonas fluorescens	P291		0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	1,3	1,5	2,1
Pseudomonas fluorescens	P307			0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	1,1	1,1	1,8
Pseudomonas fluorescens	P323		0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,7	0,8	1	1	1,9
Pseudomonas fluorescens	P325			0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	1,1	1,1	1,9
Pseudomonas fluorescens	P73		0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	1,4	1,5	1,8
Pseudomonas fluorescens	P74		0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	1,5	1,8	2
Pseudomonas fluorescens	P75		0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	1,5	1,7	1,8
Pseudomonas fluorescens	P298		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5			
Pseudomonas fluorescens	P86		0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,8	1,2	2,5
Pseudomonas fluorescens	P88		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,8	1,3	2,5
Pseudomonas fluorescens	P258		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	1,4	1,6	1,8
Pseudomonas fluorescens	P271		0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,7	0,9	1,5	2,3
Pseudomonas fluorescens	P295		0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	1,9	2	2,2
Pseudomonas fluorescens	P68		0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,8	1,2	2,1
Pseudomonas fluorescens	P173			0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,7	0,7	1,8
Pseudomonas fluorescens	P175			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	1,1	1,1	2,1
Pseudomonas fluorescens	P243			0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,9	0,9	1,7
Pseudomonas fluorescens	P244			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	1,1	1,1	2
Pseudomonas fluorescens	P245			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	1,2	1,2	1,7
Pseudomonas fluorescens	P247			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	1,3	1,3	1,8
Pseudomonas fluorescens	P249			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	1,2	1,2	1,9
Pseudomonas fluorescens	P252			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,6	0,9	1,5

Pseudomonas fluorescens	P255					0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P276					0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5
Pseudomonas fluorescens	P282				0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5
Pseudomonas fluorescens	P286							0,3	0,3	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P288				0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
Pseudomonas fluorescens	P293					0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P310					0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
Pseudomonas fluorescens	P319					0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5

**Lipolítica 7°C (Halo de  $\geq 1,8-3,0$ )  
Crescimento**

**Halo**

	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Pseudomonas fluorescens	P67			0,3	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P68			0,3	0,4	0,6	0,6	0,7	0,8	0,9
Pseudomonas fluorescens	P69			0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7
Pseudomonas fluorescens	P72			0,3	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P73			0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P74			0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P75			0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P85			0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens	P86			0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens	P88			0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
Pseudomonas fluorescens	P89			0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P92		0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
Pseudomonas fluorescens	P239		0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P240		0,2	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P241		0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P242		0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P244		0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	0,8
Pseudomonas fluorescens	P249		0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P251		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5

Pseudomonas fluorescens	P252	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	P252						0,6	1	1,4	1,6	1,9	2	2		
Pseudomonas fluorescens	P254		0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	P254							0,5	0,7	1,3	1,6	1,9	2	2,1	
Pseudomonas fluorescens	P256			0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	P256							0,3	0,5	1,2	1,5	1,6	1,7	1,8	
Pseudomonas fluorescens	P257			0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	P257							0,6	0,7	1,3	1,6	1,6	1,7	1,8	
Pseudomonas fluorescens	P271			0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	P271							0,6	1	1,7	1,9	2,2	2,3	2,4	
Pseudomonas fluorescens	P274		0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	P274							0,3	1	1,2	1,5	1,8	1,9	2,1	
Pseudomonas fluorescens	P281		0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	P281							0,5	1	1,3	1,5	1,7	1,9	1,9	
Pseudomonas fluorescens	P323		0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	P323							0,7	1,2	1,5	1,7	1,9	2,1	2,2	
Pseudomonas fluorescens	P243			0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	P243								0,8	1,3	1,4	1,5	1,6	1,6	
Pseudomonas fluorescens	P70				0,3	0,5	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	P70							1	1,6	2	2,2	2,2	2,5	2,8	
Pseudomonas fluorescens	P71				0,3	0,4	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	P71							1	1,7	1,8	2	2,3	2,5	2,5	
Pseudomonas fluorescens	P116				0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	P116								1	1,7	2	2,4	2,5	2,5	
Pseudomonas fluorescens	P173			0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	P173								0,3	0,7	1,3	1,6	1,8	2,1	
Pseudomonas fluorescens	P175			0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	P175								0,5	1,2	1,6	2	2,1	2,4	
Pseudomonas fluorescens	P247			0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	P247								0,9	1,4	1,5	1,6	1,7	1,9	
Pseudomonas fluorescens	P145														P145														
Pseudomonas fluorescens																													
Pseudomonas fluorescens	P250			0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	P250							0,2	0,8	1,3	2	2,1	2,2	2,3	2,4
Pseudomonas fluorescens	P248			0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	P248							0,2	0,6	1	1,2	1,8	2	2,1	2,2
Pseudomonas fluorescens	P260		0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	P260							0,5	1	1	1,6	1,8	1,9	2,1	2,4
Pseudomonas fluorescens	P263		0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	P263							0,5	1	1,3	1,4	1,6	1,8	1,9	2
Pseudomonas fluorescens	P267		0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	P267							0,5	1	1,1	1,7	1,9	2	2	2,1
Pseudomonas fluorescens	P275		0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	P275							0,3	1,1	1,4	1,6	1,8	2	2,1	2,2
Pseudomonas fluorescens	P276		0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	P276							1,1	1,6	1,8	2	2,1	2,3	2,4	2,4
Pseudomonas fluorescens	P283		0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	P283							0,2	0,9	1,1	1,4	1,6	1,9	2	2,2
Pseudomonas fluorescens	P285		0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	P285							0,1	0,6	0,9	1,1	1,5	1,6	1,8	1,9
Pseudomonas fluorescens	P287		0,2	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7	P287							0,5	0,9	1,1	1,5	1,7	1,9	2,2	2,2
Pseudomonas fluorescens	P288		0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	P288							0,1	0,7	0,9	1,3	1,4	1,6	1,9	1,9
Pseudomonas fluorescens	P289		0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	P289							0,5	0,8	1,2	1,4	1,5	1,7	1,9	1,9
Pseudomonas fluorescens	P301		0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	P301							0,1	0,2	0,2	0,3	1,2	1,5	1,8	1,8
Pseudomonas fluorescens	P302	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	P302							0,2	0,3	0,5	1,4	1,6	1,9	2,1	2,1

Pseudomonas fluorescens	P303	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	P303			0,2	0,2	0,4	1,1	1,6	1,8	1,9	1,9
Pseudomonas fluorescens	P309		0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	P309			0,5	0,9	1,3	1,6	1,7	2	2,3	2,3
Pseudomonas fluorescens	P310		0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	P310			0,3	0,7	1,2	1,4	1,6	1,7	2	2
Pseudomonas fluorescens	P295		0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	P295			0,6	0,9	1,2	1,5	1,6	1,9	2	2
Pseudomonas fluorescens	P290	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,7	0,7	P290		0,7	1	1,3	1,4	1,7	2	2,1	2,2	2,2
Pseudomonas fluorescens	P291	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	P291		0,4	0,7	1	1,2	1,5	1,6	1,8	1,8	1,8
Pseudomonas fluorescens	P307		0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	P307		0,2	0,7	1	1,4	1,7	1,7	2	2,2	2,2
Pseudomonas fluorescens	P298		0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	P298		0,2	0,7	1,3	1,6	1,8	2	2	2,2	2,2

**Temperatura = 10°C (Halo de ≥ 3,0)**

		Crescimento												Halo												
Pseudomonas fluorescens	P67				0,3	0,7	0,9	1	1,1	1,2	1,2	1,2						1,7	2,3	3	3,1	3,2	3,2	3,2		
Pseudomonas fluorescens	P85				0,7	0,9	0,9	1	1	1	1	1						1,5	2	2	2,3	3	3,3	3,3		
Pseudomonas fluorescens	P173				0,7	1,1	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4							1,5	2,8	2,8	3	3	3,3	3,3		
Pseudomonas fluorescens	P175				0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	1						1,7	2,8	3,1	3,1	3,2	3,2	3,2		
Pseudomonas fluorescens	P289				0,6	0,6	0,8	0,8	0,9	1	1	1						1,3	1,8	2,1	2,2	2,8	2,9	3,2		
Pseudomonas fluorescens	P319				0,6	0,9	0,9	1	1,1	1,1	1,2	1,4							2,3	2,5	2,5	2,5	3	3		
Pseudomonas fluorescens	P71				0,6	0,8	0,8	0,9	0,9	1	1,2											2,9	3,2	3,3		
Pseudomonas fluorescens	P244				0,3	0,5	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8	0,8							1	1,9	2,3	2,4	3	3,5	3,6	
Pseudomonas fluorescens	P248				0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9							0,7	1,8	2	2,2	2,5	2,6	2,8	3
Pseudomonas fluorescens	P249				0,4	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9							1,1	1,6	1,9	2,1	2,3	2,4	2,5	3
Pseudomonas fluorescens	P250				0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7							1	1,4	1,7	2	2,2	2,5	2,7	3
Pseudomonas fluorescens	P254				0,4	0,5	0,7	0,9	1	1	1,1	1,2							0,7	1,5	1,9	2,1	2,5	2,7	3	3
Pseudomonas fluorescens	P255				0,5	0,5	0,7	0,8	1	1,2	1,2	1,2							0,8	1,7	2	2,3	2,5	2,8	3,1	3,2
Pseudomonas fluorescens	P260				0,4	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9							0,8	1,9	2,5	2,6	3	3,4	3,5	3,7
Pseudomonas fluorescens	P263				0,3	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8							0,8	2	2,4	2,6	2,9	3,3	3,4	3,7
Pseudomonas fluorescens	P267				0,4	0,5	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9							1	1,8	2,2	2,2	2,2	2,5	2,6	3
Pseudomonas fluorescens	P271				0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8	0,8							1,2	1,8	2	2,4	2,5	2,5	2,8	3

Pseudomonas fluorescens	P274					0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8				P274				1	1,8	2,2	2,3	2,5	3	3,2	3,5
Pseudomonas fluorescens	P275					0,7	0,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9				P275				1,2	1,8	2,1	2,2	2,6	2,7	2,9	3
Pseudomonas fluorescens	P276					0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,9	0,9	0,9				P276				1,3	1,8	2,2	2,3	2,4	2,5	2,8	3
Pseudomonas fluorescens	P281					0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9				P281				1,5	1,9	2,1	2,5	2,7	3	3,1	3,2
Pseudomonas fluorescens	P283					0,4	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9				P283				1	1,8	2,2	2,6	2,7	3	3,2	3,4
Pseudomonas fluorescens	P285					0,4	0,5	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9				P285				0,9	1,6	2	2,2	2,5	2,8	2,9	3,3
Pseudomonas fluorescens	P286					0,4	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9				P286				1	1,7	1,9	2,2	2,4	2,5	2,8	3,1
Pseudomonas fluorescens	P287					0,4	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9				P287				1	1,7	2	2,2	2,7	2,9	3,1	3,3
Pseudomonas fluorescens	P288					0,4	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	1	1				P288				1,2	1,9	2	2,6	2,8	3	3,2	3,5
Pseudomonas fluorescens	P290					0,5	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9				P290				1,4	1,8	2	2,3	2,3	2,8	2,9	3,5
Pseudomonas fluorescens	P291					0,5	0,7	0,9	0,9	0,9	1	1	1	1				P291				1,4	1,9	2	2,2	2,3	2,8	2,9	3
Pseudomonas fluorescens	P293					0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8				P293				1,2	1,9	2,2	2,5	2,8	3,1	3,1	3,5
Pseudomonas fluorescens	P309					0,5	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	1	1	1				P309				1,4	2,2	2,5	2,9	3	3,2	3,2	3,5
Pseudomonas fluorescens	P310					0,6	0,8	0,8	0,8	0,9	1	1	1	1				P310				1,2	2	2,5	2,8	3	3	3,1	3,2
Pseudomonas fluorescens	P323					0,4	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9				P323				1,3	1,7	2,3	2,6	2,7	2,8	2,8	3

### Temperatura = 21°C

Lipólise	Crescimento						Halo																
Pseudomonas fluorescens							P67	0,3	0,3	0,5	0,6						P67			0,8	1,2	1,7	2
Pseudomonas fluorescens							P68	0,3	0,3	0,9	1,2						P68			0	1,7	2	2
Pseudomonas fluorescens							P69	0,3	0,3	0,5	0,7						P69			0	0,8	1,4	1,4
Pseudomonas fluorescens							P70	0,4	0,4	0,7	1						P70			0,5	1,6	1,7	1,7
Pseudomonas fluorescens							P71	0,4	0,4	0,7	1						P71			0,5	1,8	1,8	1,8
Pseudomonas fluorescens							P72	0,3	0,3	0,5	0,7						P72			0,7	1,4	1,8	1,8
Pseudomonas fluorescens							P73	0,3	0,3	0,4	0,6						P73			0,7	1,3	1,6	1,6
Pseudomonas fluorescens							P74	0,3	0,3	0,4	0,5						P74			0,7	1,1	1,4	1,4
Pseudomonas fluorescens							P75	0,2	0,2	0,4	0,6						P75			0,7	1,3	1,6	1,6
Pseudomonas fluorescens							P78	0,3	0,3	0,4	0,5						P78			0,5	1	1,2	1,2
Pseudomonas fluorescens							P85	0,3	0,3	0,4	0,4						P85			0,8	1,3	1,5	1,5
Pseudomonas fluorescens							P86	0,3	0,3	0,4	0,5						P86			0,8	1,6	1,9	1,9



Pseudomonas fluorescens	P88	0,3	0,5	0,5	0,5	P88	0,8	1	1,8
Pseudomonas fluorescens	P89	0,3	0,4	0,6		P89	1	1,1	2
Pseudomonas fluorescens	P92	0,2	0,2	0,3		P92	0,4	0,9	1,1
Pseudomonas fluorescens	P116	0,3	0,4	0,5		P116	0	1	1,5
Pseudomonas fluorescens	P129	0,2	0,4	0,4		P129	0,6	1	1,2
Pseudomonas fluorescens	P145	0,4	0,5	0,6		P145	0,8	1,3	1,4
Pseudomonas fluorescens	P147	0,3	0,4	0,4		P147	0,5	1	1,5
Pseudomonas fluorescens	P148	0,2	0,3	0,4		P148	0,4	1	1,3
Pseudomonas fluorescens	P169	0,4	0,6	0,7		P169	0,5	1,1	1,6
Pseudomonas fluorescens	P173	0,2	0,4	0,6		P173	0,5	1,3	1,6
Pseudomonas fluorescens	P175	0,4	0,5	0,7		P175	0,3	1,3	1,8
Pseudomonas fluorescens	P225	0,4	0,6	0,7		P225	0,2	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P226	0,3	0,5	0,6		P226	0,4	0,7	0,7
Pseudomonas fluorescens	P227	0,4	0,5	0,6		P227	0,2	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P228	0,3	0,4	0,5		P228	0,3	0,6	0,7
Pseudomonas fluorescens	P229	0,3	0,4	0,6		P229	0,3	0,6	0,6
Pseudomonas fluorescens	P230	0,3	0,4	0,5		P230	0,3	0,5	0,7
Pseudomonas fluorescens	P231	0,2	0,4	0,5		P231	0,3	0,3	0,5
Pseudomonas fluorescens	P232	0,3	0,4	0,5		P232	0,3	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P239	0,3	0,5	0,6		P239	0,3	1,2	1,7
Pseudomonas fluorescens	P240	0,3	0,5	0,6		P240	0,4	1,3	1,7
Pseudomonas fluorescens	P241	0,4	0,5	0,7		P241	0,4	1,4	1,9
Pseudomonas fluorescens	P242	0,3	0,5	0,7		P242	0,5	1,3	1,6
Pseudomonas fluorescens	P243	0,3	0,5	0,6		P243	0,8	1,2	1,4
Pseudomonas fluorescens	P244	0,4	0,5	0,7		P244	0,6	1,6	2
Pseudomonas fluorescens	P245	0,3	0,5	0,6		P245	0,8	1,1	1,4
Pseudomonas fluorescens	P246	0,4	0,6	0,8		P246	0,6	0,8	0,9
Pseudomonas fluorescens	P247	0,3	0,5	0,6		P247	0,7	1,1	1,3
Pseudomonas fluorescens	P248	0,4	0,6	0,7		P248	0,7	1,1	1,3
Pseudomonas fluorescens	P249	0,4	0,6	0,7		P249	0,6	1,1	1,4
Pseudomonas fluorescens	P250	0,4	0,6	0,7		P250	0,8	1,2	1,6
Pseudomonas fluorescens	P251	0,3	0,5	0,8		P251	0,5	1	1
Pseudomonas fluorescens	P252	0,3	0,4	0,6		P252	0,6	1,1	1,5

Pseudomonas fluorescens	P253	0,3	0,5	0,7	P253	0,5	0,5	0,6
Pseudomonas fluorescens	P254	0,4	0,6	0,8	P254	0,4	1,2	2
Pseudomonas fluorescens	P255	0,3	0,5	1	P255	0,4	1	1,1
Pseudomonas fluorescens	P256	0,3	0,4	0,6	P256	0,5	0,8	1
Pseudomonas fluorescens	P257	0,3	0,4	0,6	P257	0,5	0,9	1,1
Pseudomonas fluorescens	P258	0,3	0,4	0,7	P258	0,4	0,7	0,8
Pseudomonas fluorescens	P260	0,4	0,6	0,7	P260	0,9	1,3	1,4
Pseudomonas fluorescens	P263	0,4	0,6	0,8	P263	0,7	1,2	1,5
Pseudomonas fluorescens	P271	0,4	0,6	0,7	P271	0,7	1,1	1,5
Pseudomonas fluorescens	P274	0,2	0,5	0,7	P274	0,5	1	1,4
Pseudomonas fluorescens	P275	0,4	0,5	0,7	P275	0,6	1	1,2
Pseudomonas fluorescens	P276	0,3	0,5	0,6	P276	0,7	1,1	1,4
Pseudomonas fluorescens	P278	0,3	0,6	0,7	P278	0	0,4	0,5
Pseudomonas fluorescens	P280	0,4	0,6	0,7	P280	0,5	1	1,2
Pseudomonas fluorescens	P281	0,4	0,6	0,7	P281	0,6	0,9	1,1
Pseudomonas fluorescens	P282	0,4	0,6	0,6	P282	0,6	1,1	1,4
Pseudomonas fluorescens	P283	0,3	0,4	0,5	P283	0,4	1,1	2,5
Pseudomonas fluorescens	P285	0,3	0,5	0,6	P285	0,3	0,5	1,4
Pseudomonas fluorescens	P286	0,3	0,5	0,6	P286	0,5	0,8	1,1
Pseudomonas fluorescens	P287	0,4	0,7	0,7	P287	0,6	0,6	1,4
Pseudomonas fluorescens	P288	0,4	0,7	0,7	P288	0,5	0,7	1,4
Pseudomonas fluorescens	P289	0,6	0,6	0,7	P289	1,4	1,5	1,8
Pseudomonas fluorescens	P290	0,3	0,5	0,6	P290	0,5	1,3	1,5
Pseudomonas fluorescens	P291	0,3	0,5	0,6	P291	0,5	0,6	1,4
Pseudomonas fluorescens	P293	0,3	0,8	0,8	P293	0,4	0,6	1,4
Pseudomonas fluorescens	P294	0,3	0,6	0,7	P294	0,2	0,5	0,8
Pseudomonas fluorescens	P295	0,2	0,4	0,5	P295	0,4	1	1,3
Pseudomonas fluorescens	P297	0,3	0,5	0,7	P297	0	0,2	0,3
Pseudomonas fluorescens	P298	0,3	0,4	0,6	P298	0,7	1,4	1,4
Pseudomonas fluorescens	P300	0,4	0,6	0,6	P300	0	0,8	0,8
Pseudomonas fluorescens	P301	0,4	0,4	0,4	P301	0	1	1,6
Pseudomonas fluorescens	P302	0,4	0,4	0,4	P302	0	1,2	1,6
Pseudomonas fluorescens	P303	0,2	0,3	0,4	P303	0	0,9	1,4

Pseudomonas fluorescens	P307	0,4	0,5	0,7	P307	0,5	1,2	1,4
Pseudomonas fluorescens	P309	0,3	0,5	0,6	P309	0,9	1,2	1,6
Pseudomonas fluorescens	P310	0,5	0,6	1	P310	1	1,3	1,5
Pseudomonas fluorescens	P316	0,4	0,5	0,7	P316	0,2	0,5	0,8
Pseudomonas fluorescens	P317	0,4	0,6	0,7	P317	0,3	0,5	0,8
Pseudomonas fluorescens	P318	0,4	0,5	0,6	P318	0,2	0,4	0,6
Pseudomonas fluorescens	P319	0,3	0,5	0,5	P319	0,3	1,1	1,5
Pseudomonas fluorescens	P323	0,4	0,5	0,6	P323	0,9	1,2	1,5
Pseudomonas fluorescens	P325	0,4	0,5	0,6	P325	0,5	1,2	1,6

## ANEXO 3 – Análise Estatística

### Proteólise Gram negativas

Proteólise a 4°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	105 86.78	16 13.22	121
i	73 56.59	56 43.41	129
	178	72	250

$$X^2 = 27,0 * (P < 0.01)$$

Proteólise a 7°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	81 66.94	40 33.06	121
i	63 48.84	66 51.16	129
	144	106	250

$$X^2 = 8.3799 * (P = 0.0038)$$

Proteólise a 10°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	45 38.02	75 61.98	121
i	48 37.21	81 62.79	129
	94	156	250

$$X^2 = 0.0173 * (P = 0.8952)$$

Proteólise a 21°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	71 58.68	50 41.32	121
i	54 41.86	75 58.14	129
	125	125	250

$$X^2 = 7.0632 * (P = 0.0079)$$

**Lipólise Gram Negativas**

Lipólise a 4°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	55 45.45	66 54.55	121
i	16 12.40	113 87.60	129
	71	179	250

$X^2 = 33.5417$  \* (P<0.0001)

Lipólise a 7°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	43 35.54	78 64.46	121
i	6 4.65	123 95.35	129
	49	201	250

$X^2 = 37.7961$  \* (P<0.0001)

Lipólise a 10°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	43 35.54	78 64.46	121
i	26 20.16	103 79.84	129
	69	181	250

$X^2 = 7.3930$  \* (P<0.0065)

Lipólise a 21°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	44 36.36	77 63.64	121
i	7 5.43	122 94.57	129
	51	199	250

$X^2 = 36.8007$  \* (P<.0001)

**Proteólise Gram Positivas**

Proteólise a 4°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	44 100.00		44
i	15 100.00		15
	59		59

Proteólise a 7°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	15 34.09	29 65.91	44
i	15 100.00	0 0.00	15
	30	29	59

$$X^2 = 19.4432* (P<0.001)$$

Proteólise a 10°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	6 13.64	38 86.36	44
i	12 80.00	3 20.00	15
	18	41	59

$$X^2 = 23.2381 * (P<0.001)$$

Proteólise a 21°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	10 22.73	34 77.27	44
i	12 80.00	3 20.00	15
	18	41	59

$$X^2 = 15.6916 * (P<0.001)$$

**Lipólise Gram Positivas**

Lipólise a 4°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	44		44
	100.00	0.00	
i	9	6	15
	60.00	40.00	
	53	6	59

$$X^2 = 19.5925 \quad P < .0001$$

Lipólise a 7°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	42	2	44
	95.45	4.55	
i	8	7	15
	53.33	46.67	
	50	9	59

$$X^2 = 15.3527 \quad * (P < 0.001)$$

Lipólise a 10°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	20	24	44
	45.45	54.55	
i	7	8	15
	46.67	53.33	
	27	32	59

$$X^2 = 0.0066 \quad * (P = 0.9351)$$

Lipólise a 21°C

Tipo de tanque	O	1	Total
c	42	2	44
	95.45	4.55	
i	7	8	15
	46.67	53.33	
	18	41	59

$$X^2 = 18.9158 \quad * (P < 0.001)$$