

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE NÃO PROCESSADO,
COLETADO POR MEIO DE ORDENHA MANUAL.

BOLSISTA: Shyrleyde Podgurski Ale, Fapeam

MANAUS/AM

2009

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE NÃO PROCESSADO,
COLETADO POR MEIO DE ORDENHA MANUAL.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB – A/0074/2008

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE NÃO PROCESSADO,
COLETADO POR MEIO DE ORDENHA MANUAL.

Bolsista: Shyrleyde Podgurski Ale, Fapeam

Orientador: Prof^o MSc Joel Lima da Silva Junior

MANAUS/AM

2009

RESUMO

Em nossa região o principal problema na produção leiteira é o manejo higiênico-sanitário inadequado decorrente da falta de instrução dos produtores, que em sua maioria são de pequeno porte e ficam distantes da capital. Logo tem uma produção pequena para abastecer o mercado local, que em sua grande maioria não é exigente quanto a higiene e não oferece estrutura ou informação ao produtor.

Devido ao sucesso dos programas de manejo higiênico-sanitário em outras instituições, a pesquisa teve o intuito de testar e avaliar microbiologicamente os animais e seu ordenhador, com dois tratamentos sendo um com álcool 70% e outro com solução de hipoclorito de sódio e tratamento de testemunha onde não houve nenhuma interferência na hora da ordenha. As amostras foram obtidas de 10 vacas lactantes, sem levar em consideração a idade, raça e período de lactação. As análises foram feitas em laboratório para realizar a identificação, primeiro foram analisadas as amostras por meio de GRAM para serem divididas em bacilos G+ e G- cocos G+ e G-.

Foi observado um declínio no crescimento microbiológico entre os tratamentos, sendo o tratamento com hipoclorito o que obteve o menor crescimento microbiológico, sendo que na sua maioria foram encontrados microorganismos que não possuem literatura indicando problemas para o ser humano. Porém foi encontrada *Salmonella sp* mas não em grandes quantidades, podendo ser concluído que esta pode ser oriunda do ordenhador e não do animal.

Palavras chaves: Leite, Fazenda Experimental, Análise microbiológica, assepsia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. OBJETIVOS	08
2.1. Objetivo Geral	08
2.2. Objetivos Específicos	08
3. REVISÃO LITERÁRIA	09
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Material	10
4.2 Metodologia	10
4.2.1 Local da Amostragem.....	10
4.2.2 Animais.....	10
4.2.3 Obtenção das amostras e coleta.....	10
4.2.4 Processamento da amostra.....	11
4.2.5 Identificação.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÃO.....	15
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados finais das análises de leite.....	12
Tabela 2: Resultados finais das análises de leite , tratamento com álcool 70%	13
Tabela 3: Resultados finais das análises de leite , tratamento com hipoclorito de sódio....	14

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Leite não processado	10
--------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

Em nossa região o principal problema na produção leiteira o manejo higiênico-sanitário inadequado decorrente da falta de instrução dos produtores, que em sua maioria são de pequeno porte e ficam distantes da capital. Logo tem uma produção pequena para abastecer o mercado local, que em sua grande maioria não é exigente quanto a higiene e não oferece estrutura ou informação ao produtor.

Segundo Da Fonseca *et al.*, (1999), a boa qualidade do leite deve ser caracterizado basicamente, através das características sensoriais, nutricionais, físico-químico e microbiológicas: sabor agradável, alto teor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes, tais como os antibióticos, pesticidas, adição de água, sujidades, etc..., reduzida contagem de células somáticas e, baixa carga microbiana. A qualidade do leite é reflexo da saúde da glândula mamária e, das condições gerais de manejo e de higiene adotadas na propriedade.

A ação da temperatura frente ao crescimento bacteriano, segundo estudos na França e nos EUA, indicam que o leite deve atingir os +04°C nas duas primeiras horas após a ordenha, sendo necessário que o equipamento seja eficiente para diminuir a temperatura de +38°C para +10°C em até uma hora após a ordenha e atingir +04°C no dia seguinte. Neste processo não deve-se esquecer de um grupo bacteriano que se desenvolve em temperatura de refrigeração comercial que são as bactérias psicrófilas (+04°C a +07°C) (Fagundes, 1997).

As bactérias psicrófilas tem origem nos utensílios, nos pêlos do animal, nas águas contaminadas, resíduos de forragem etc. As principais bactérias deste grupo são *Pseudomonas* spp.; *Flavobacterium* spp.; *Enterobacter* spp.; *Escherichia coli* etc., porém são na sua maioria destruídas pelo processo de pasteurização, porém alguns gêneros produzem enzimas (lípases), que resistem tratamentos térmicos elevados (+72°C, 30 minutos) (Fagundes, 1997).

Para avaliar os parâmetros da qualidade do produto a matéria prima deve ser submetida a testes físico-químicos e microbiológicos visando a qualidade do produto. Para coletar o material na propriedade tem-se que considerar uma homogeneidade da amostra, volume, frequência, número de amostras, controle da temperatura da amostra durante o processo, identificação e estocagem em recipientes refrigerados(Fagundes, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Verificar o estado higiênico e sanitário da glândula mamária, do rebanho bovino leiteiro de uma fazenda produtora de leite, a fim de melhorar a qualidade dos produtos e subprodutos, evitando, desta forma, problemas de saúde pública.

2.2 – OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar o manejo higiênico-sanitário da ordenha;
- Realizar análises microbiológicas do leite;

3. REVISÃO LITERÁRIA

O leite ocupa um lugar muito importante na dieta humana, pois é rico em nutrientes e energéticos, o que o torna um alimento recomendável para todas as faixas etárias (AVILA, C. R.; GALLO, C. R. 1996). No entanto, devido ao seu alto valor nutritivo, o leite se constitui em um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive aqueles consideráveis patogênicos para a população humana (LEITE, C. C., et al, 2002; EUTHIER, S. M.F. et al., 1998).

Com relação às bactérias, o leite pode proporcionar o desenvolvimento de dois grandes grupos principais: os mesófilos que se desenvolvem muito bem em uma temperatura de 30 a 45 °C e os psicrótróficos que se desenvolvem bem numa temperatura próxima a 25 a 30 °C, mas que independente disso podem se multiplicar a 7°C ou menos (ARCURI, E. F. et al., 2006; ZOCHE, F. et al., 2002).

Segundo alguns autores, a contaminação do leite cru por essas bactérias pode ocorrer a partir do próprio animal, do homem e do ambiente (BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S , 2000 ; SLAGHUIS, 1996 ARCURI, E. F. et al., 2006; EUTHIER, S. M.F. et al., 1998).

Além de significarem um risco a saúde do consumidor, as bactérias ou suas enzimas provocam várias alterações no leite e seus derivados, como sabores e aromas indesejáveis, diminuição da vida de prateleira, interferência nos processos tecnológicos, entre outros (ARCURI, E. F. et al., 2006). Visando a destruição desses microrganismos, o leite deve passar por um tratamento térmico como a pasteurização ou esterilização (LEITE, C. C., et al, 2002). No entanto, muitos estudos revelam que a qualidade final do leite, independente do tipo de tratamento térmico que sofrerá, está diretamente associada à carga microbiana inicial do produto (LEITE, C. C., et al, 2002; FAGUNDES, C. M. et al., 2006; EUTHIER, S. M.F. et al., 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material



Figura 1: Leite não processado.

Foto: Shyrleyde P. Ale, 2008.

4.2 Metodologia

4.2.1 Local da amostragem

O experimento foi desenvolvido no setor de Bovinocultura da Fazenda Experimental da UFAM e no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biologia da UFAM.

4.2.2 Animais

As amostras foram obtidas de 10 vacas lactantes, sem levar em consideração a idade, raça e período de lactação.

4.2.3 Obtenção das Amostras e Coleta

Conforme o relatório de campo os animais foram identificados, enumerados, e foram sorteados 2 tetos para serem ordenhados, as amostras foram armazenadas e analisados no laboratório de microbiologia do ICB na Universidade Federal do Amazonas.

A ordenha foi realizada manualmente, desprezando os primeiro três jatos de leite, coletando a partir deste momento, a fim de, avaliar o grau de contaminação. O produto foi coletado por meio de um tubo de ensaio com dez mililitros (10 ml), devidamente identificado por meio de uma etiqueta fixada na parte externa de cada tubo, e marcada com lápis, o número do brinco, cada teto: posterior direito (PD), posterior esquerdo (PE), anterior esquerdo (AE) anterior direito (AD), quem coletou e a data de coleta.

Após coletado o produto, foi lacrado com fita adesiva e acondicionado em uma caixa térmica de isopor contendo gelo (gelox), para proporcionar a temperatura de acondicionamento até o laboratório.

4.2.4 Processamento da amostra

Para a preparação da diluição foram utilizados 1mL do leite coletado com ordenha manual, que foi diluído em água destilada sucessivamente até 10^{-4} . A diluição foi semeada em placas com EMB (à 45°C e à 37°C) PCA e Manitol.

Após a semeadura foram levados para estufa para crescimento e iniciaram-se os processos de preparação de meios de cultura para isolamento e identificação dos agentes.

4.2.5. Identificação

Para realização da identificação, primeiro foram analisadas as amostras por meio de GRAM para serem divididas em bacilos G+ e G- cocos G+ e G- pois cada um desses quatro são analisados de forma e com meios distintos até a descoberta do gênero.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA, que dita os padrões aceitáveis e inaceitáveis de microorganismos em produtos alimentícios, a presença de *Salmonella sp.* é inaceitável. De acordo com os resultados encontrados entre os tratamentos, sendo um de testemunha, um com álcool 70% e outro com hipoclorito de sódio (ppm) , houve um declínio de crescimento microbiológico entre os tratamentos, sendo que o tratamento com hipoclorito foi com o que se obteve o menor crescimento, sendo que na sua maioria foram encontrados microorganismos que não possuem literatura indicando problemas para o ser humano. Porém foi encontrada *Salmonella sp* mas não em grandes quantidades, podendo ser concluído também que esta pode ser oriunda do ordenhador e não do animal.

Animal	Teto	Microorganismos	Animal	Teto	Microorganismos
1	PE	<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Ewingella americana</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Citrobacter freundii</i>	6	AE	<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Listéria sp</i> <i>Hafnia alvei</i>
	PD	Sem crescimento		PE	Sem crescimento
2	PE	<i>Klebisiella ozaenae</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Listéria sp</i>	7	PE	<i>Corynebacterium sp</i>
	AE	Sem crescimento		AE	Sem crescimento
3	PE	<i>Listéria sp</i>	8	AD	Sem crescimento
	AE	Sem crescimento		AE	Sem crescimento
4	PE	<i>Leclercia adecarbolxilata</i>	9	AD	<i>Citrobacter freundii</i>
	PD	<i>Leclercia adecarbolxilata</i>		PE	Sem crescimento
5	PE	<i>Leclercia adecarbolxilata</i> <i>Citrobacter freundii</i>	10	PD	<i>Hafnia alvei</i>
	AD	Sem crescimento		AD	<i>Listéria sp</i>

Tabela 1: Resultados finais das análises de leite , tratamento testemunha.

Legenda: anterior esquerdo (AE); anterior direito (AD); posterior esquerdo (PE); posterior direito (PD).

No tratamento com álcool 70% foi realizada a assepsia das mãos do ordenhador, dos tetos dos animais e posteriormente foram borrifados com a solução e secados com papel toalha, acondicionados em tubos estéreis e posterior análise laboratorial.

Animal	Teto	Microorganismos	Animal	Teto	Microorganismos
1	AD	Sem crescimento	6	AE	Sem crescimento
	AE	Sem crescimento		PD	Sem crescimento
2	AE	<i>Klebsiella ozaenae</i>	7	PD	<i>Listéria sp</i>
	PE	Sem crescimento		PE	Sem crescimento
3	AD	<i>Listéria sp</i>	8	PE	<i>Corynebacterium sp</i>
	PE	<i>Citrobacter freundii</i>		AE	<i>Leclercia adecarbolxilata</i>
4	AD	Sem crescimento	9	PE	<i>Citrobacter freundii</i>
	AE	Sem crescimento		PD	Sem crescimento
5	AD	<i>Leclercia adecarbolxilata</i> <i>Citrobacter freundii</i>	10	AE	<i>Hafnia alvei</i>
	AE	Sem crescimento		PE	Sem crescimento

Tabela 2: Resultados finais das análises de leite , tratamento com álcool 70%

Legenda: anterior esquerdo (AE); anterior direito (AD); posterior esquerdo (PE); posterior direito (PD).

No tratamento com hipoclorito de sódio foi realizada a assepsia das mãos do ordenhador, dos tetos dos animais e posteriormente foram borrifados com a solução e secados com papel toalha, acondicionados em tubos estéreis e posterior análise laboratorial.

Animal	Teto	Microorganismos	Animal	Teto	Microorganismos
1	AE	<i>Klebisiella ozaenae</i>	6	AD	<i>Listéria sp</i>
	AD	Sem crescimento		AE	Sem crescimento
2	AE	<i>Listéria sp</i>	7	PD	Sem crescimento
	PD	Sem crescimento		AD	<i>Klebisiella ozaenae</i>
3	PD	<i>Listéria sp</i>	8	PD	Sem crescimento
	AD	Sem crescimento		AD	Sem crescimento
4	AE	Sem crescimento	9	AE	<i>Citrobacter freundii</i>
	PE	Sem crescimento		AD	Sem crescimento
5	PD	Sem crescimento	10	PE	<i>Hafnia alvei</i>
	AD	Sem crescimento		AD	<i>Listéria sp</i>

Tabela 3: Resultados finais das análises de leite , tratamento com hipoclorito de sódio.

Legenda: anterior esquerdo (AE); anterior direito (AD); posterior esquerdo (PE); posterior direito (PD).

6. CONCLUSÃO

- Houve crescimento microbiológico de *Salmonella enteritidis*, *Ewingella americana*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*.entre outras.
- O crescimento da *Salmonella enteritidis* pode ter sido oriundo da mão do ordenhador pois o seu crescimento só foi identificado no tratamento testemunha.
- O tratamento com o hipoclorito de sódio foi o que teve melhor desempenho higiênico-sanitário.
- O manejo com hipoclorito é de fácil realização para o pequeno produtor.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F. et al. **Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas.** Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec., v. 58, n3, p.440-445, 2006.

AVILA, C. R.; GALLO, C. R. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “minas frescal” comercializado no município de Piracicaba – SP.** Sci. agric., Piracicaba Ene.,v. 53, n. 1, abr. 1996.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S. **Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetida a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite.** Cienc. Rural, Santa Maria, v.30, n.5, p. , set./out. 2000.

Da Fonseca, L.F.L; Pereira, C.C & De Carvalho, M.P. **Qualidade Microbiológica do Leite.** Anais do 4º Simpósio Internacional Sobre Produção Intensiva de leite, Caxambu – MG, p.36-43 1999.

EUTHIER, S. M.F. et al. **Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra “tipo coalho”, artesanal elaborado no Curimataú paraibano.** Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 18 n. 2 Campinas Mayo/Jul. 1998.

FAGUNDES, C. M. et al. **Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado.** Cienc. Rural vol.36 no.2 Santa Maria Mar./Apr. 2006.

FAGUNDES, C.M. (1997). **Inibidores e Controle de Qualidade do Leite.** Ed. Universitária – UFPel. Pelotas, RS. 115p. 1997

LEITE, C. C., et al. **Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia.** Rev. Brás. Saúde Prod. 2002; 3 (1): 21-25.

ZOCHE, F. et al. **Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná.** Archives of Veterinary Science. V. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.