

# MICROORGANISMOS PSICOTRÓFICOS EM LEITES SUBMETIDOS À ULTRA ALTA TEMPERATURA

## *(PSYCHROTROPHIC BACTERIA IN ULTRA-HIGH-TEMPERATURE MILK)*

### RESUMO

Os efeitos da ultra alta temperatura no leite incluem vantagens como destruição de 100% dos patógenos do leite e de aumento do tempo de prateleira do produto através da esterilidade comercial em relação a micro-organismos deteriorantes. Tendo isso em vista, bactérias psicrotróficas estão associadas a diversos efeitos negativos nos produtos finais devido à resistência de alguns esporos ao processamento, além da atividade residual de enzimas termorresistentes extracelulares. Com isso, esse trabalho teve como objetivo quantificar bactérias psicrotróficas em leites tratados por ultra alta temperatura de duas marcas populares comercializadas em grandes redes de supermercado em Curitiba, Paraná. Foram avaliadas 60 amostras de três lotes diferentes de cada marca por meio da contagem de bactérias psicrotróficas, lactofermentação e classificação da colônia encontrada pelo método de Gram. As amostras foram avaliadas antes e após incubação a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Das 30 amostras pré-incubadas das marcas A e B, nenhuma apresentou crescimento bacteriano, 20 (66,7%) não produziram coágulo e 10 (33,3%) produziram coágulo esponjoso. Das 30 que não foram pré-incubadas, apenas uma apresentou crescimento bacteriano (3,4%), 25 (83,3%) não formaram coágulo, e 5 (16,7%) produziram coágulo esponjoso. Desta forma, o processo UHT utilizado por ambas as marcas garantiu efetividade na esterilização dos leites quanto a bactérias psicrotróficas, mas os resultados encontrados no teste de lactofermentação indicam possível contaminação por micro-organismos mesófilos.

Palavras-chave: microbiota psicrotrófica, qualidade microbiológica, leite longa vida.

24

25

## ABSTRACT

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

The beneficial effects of ultra-pasteurization include 100% destruction of milk pathogens, besides increasing the product's shelf-life through commercial sterility regarding deteriorating micro-organisms. With that in mind, psychrotrophic bacteria are associated with several negative effects in the final product from the food industry because of heat-resistant spores and its residual extracellular heat-resistant enzymes activity. This paper aimed to quantify psychrotrophic bacteria in UHT milk from two different well-known brands sold in big supermarket chains from Curitiba, Paraná. The heat-treating process effectiveness was evaluated in a total of 60 samples from 3 different production batches of each brand through the surface inoculation method in PCA, milk clotting test and classification of the colonies found by the Gram method. From the 30 preincubated samples at  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 7 days of the A and B brands, none presented bacterial growth, 20 (66,7%) did not clot, and 10 (33,3%) produced sponge clots. From the 30 not preincubated, only 1 showed bacterial growth (3,4%), 25 (83,3%) did not clot, and 5 (16,7%) produced sponge clots. In conclusion, the effectiveness of the UHT processes from both brands eliminating psychrotrophic bacteria was granted, but the milk clotting test results indicates possible mesophilic microorganism contamination.

42

43

## INTRODUÇÃO

44

45

46

A refrigeração do leite cru é eficaz no controle de bactérias classificadas como mesófilas (DAS et al. 2015). Contudo, bactérias psicrófilas são um subgrupo que desenvolve resistência a baixas temperaturas por sintetizar fosfolipídios e lipídeos, que permitem sua viabilidade por

47 manter sua fluidez, transporte de solutos e secreção de enzimas extracelulares (OLIVEIRA et al.  
48 2015).

49 O processo popularmente conhecido como Ultra High Temperature - UHT, ou  
50 ultrapasteurização, tem como objetivo garantir a esterilidade comercial do leite, destruindo 99,9%  
51 dos micro-organismos presentes por meio da utilização do binômio tempo/temperatura 130°C a  
52 150°C por 2 a 4 segundos, seguido de resfriamento a menos de 32°C e envase em condições  
53 assépticas (NERO et al. 2017). Contudo, esporos de bactérias psicrotróficas são capazes de resistir  
54 ao processo, posteriormente se multiplicando e produzindo enzimas termotolerantes. Esse é um dos  
55 principais meios pelo qual bactérias psicrotróficas causam diversos problemas como sabores  
56 indesejáveis no leite, instabilidade físico-química, entre outros devido a ação de peptidases e  
57 lipases. (MACHADO et al. 2017).

58 A permanência dessas enzimas, apesar da redução da carga microbiana pelo processo de  
59 temperatura, é um fator limitante da qualidade do leite e derivados. Essas peptidases e lipases são  
60 enzimas hidrolíticas, que agem quebrando componentes importantes do alimento - proteínas, e  
61 lipídeos, respectivamente (RIBEIRO JUNIOR et al. 2018). Apesar de sua importância na indústria  
62 alimentícia, quando manipuladas para efeitos benéficos - sabores de queijos, entre outras  
63 características (TAVANO, 2013), quando fora de controle, elas são responsáveis pela quebra das  
64 principais estruturas do leite, como proteínas, gordura e lecitina (VON NEUBECK et al. 2015).  
65 Uma das proteínas que podem ser hidrolisadas nesse processo é a caseína. Sua quebra contribui  
66 para a desestabilização do leite e para a ocorrência de sedimentação durante o armazenamento  
67 (MATEÓS et al. 2015).

68 Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo enumerar bactérias psicrotróficas  
69 em leites UHT comercializados na região de Curitiba, Paraná, avaliando a efetividade do processo

70 térmico em eliminar esses micro-organismos, garantindo a esterilidade comercial do produto  
71 durante sua vida de prateleira.

72

73

## MATERIAIS E MÉTODOS

74 Foram adquiridas amostras de leite integral UHT no comércio varejista (mercados e  
75 supermercados) de Curitiba, PR e região. Duas marcas (identificadas como A e B) que  
76 frequentemente estão disponíveis no comércio varejista da região foram selecionadas, consideradas  
77 amostras de ocasião. As aquisições ocorreram quinzenalmente em três momentos distintos. A cada  
78 aquisição 10 unidades do mesmo lote eram testadas, totalizando 60 amostras ao fim do experimento.  
79 Das 10 amostras adquiridas na quinzena, cinco unidades foram processadas no dia da compra, e as  
80 outras cinco foram processadas após pré-incubação a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias.

81 O processamento começou com a higienização externa das embalagens, com água e  
82 detergente, seguida de secagem e aplicação de álcool 70%. A segunda etapa consistiu em submeter  
83 o leite à contagem bacteriana total (CBT). Para isso, foram preparadas diluições em NaCl 0,85%.  
84 Em seguida, foi realizada a semeadura em superfície em Ágar não-seletivo *Plate Count Agar* (PCA)  
85 em placas de Petri. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 10 dias a  $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , seguida de  
86 contagem total das colônias (SWANSON et al. 2001). Duas colônias de cada placa foram  
87 submetidas à coloração de Gram, e identificação morfológica em microscopia óptica.

88 Adicionalmente foi realizada a prova de lactofermentação para cada uma das 60 amostras,  
89 contendo 10 mL de cada amostra em tubos de ensaio estéreis com tampa de rosca, que foram  
90 incubados a  $36\text{-}37^{\circ}\text{C}$ , com leituras nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas (PINTO et al. 2006).

91 As análises foram processadas no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de

92 Alimentos (LACQSA) da UFPR.

93

94

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

95 Poucas amostras apresentaram contagens de micro-organismos psicrotróficos. Das 15  
96 amostras que não foram pré-incubadas da marca A, apenas uma (7,7%) apresentou crescimento  
97 bacteriano, com  $\geq 2,50 \times 10^2$  UFC/mL (Tabela 1). Já das outras 15 amostras pré-incubadas da  
98 mesma marca, as contagens foram  $\leq 1,0 \times 10^0$  UFC/mL.

99 É sabido que a presença de bactérias deteriorantes no leite UHT é indicativa de condições  
100 higiênicas inadequadas na cadeia produtiva, principalmente na ordenha (uso de leite cru de baixa  
101 qualidade), no sistema de envase e nos equipamentos de tratamento térmico (WESTHOFF &  
102 DOUGHERTY 1981). Entretanto, tendo em vista que a amostra com crescimento bacteriano não  
103 foi pré-incubada, e nenhuma das pré-incubadas apresentaram contagem significativa, existe a  
104 possibilidade dessa única amostra ter sofrido contaminação externa durante o seu processamento  
105 no laboratório.

106 Quanto às 30 amostras da marca B (pré-incubadas e não pré-incubadas), nenhuma  
107 apresentou contagem superior a  $1,0 \times 10^0$  UFC/mL. Esses resultados são semelhantes aos  
108 encontrados por SAEKI EK & MATSUMOTO LS (2010) e ROSSI JÚNIOR OD et al. (2006), que  
109 também demonstraram a eficácia do processo UHT no controle da multiplicação de bactérias  
110 psicrotróficas. Isso indica eficiência no processo UHT, na higiene geral da cadeia produtiva e de  
111 uso de matéria prima adequada.

112 VIDAL et al. (2017), procurando as principais fontes de contaminação por bactérias  
113 psicrotróficas em tanques de expansão de dez fazendas leiteiras, verificaram que a má higienização  
114 da mão de ordenhadores, da superfície dos tetos das vacas, das teteiras e dos tanques de

115 resfriamento é a principal causa da presença das bactérias no leite cru. O resfriamento do leite não  
116 é garantia de boa qualidade. O primeiro ponto de controle é garantir que o leite cru seja coletado  
117 sob condições sanitárias adequadas e que minimizem a contaminação (BEALES 2004). Outro fator  
118 de risco importante inerente à presença desses micro-organismos no leite é a formação de biofilme  
119 por bactérias do gênero *Pseudomonas* (MANN & WOZNIAK 2012), que são comunidades  
120 bacterianas envolvidas por uma matriz de polissacarídeos (DONLAN 2002), conferindo alta  
121 resistência e persistência a métodos de controle de contaminação.

122 Quanto aos resultados observados na coloração de Gram (Tabela 2), a única amostra com  
123 contagem significativa foi isolada e analisada, apresentando bactérias baciliformes gram-negativas

124 Esse resultado está de acordo com estudos apresentados por STEPANIAK (1997), que  
125 sugere que a grande maioria dos contaminantes psicrotróficos do leite sejam gram-negativos, e em  
126 número muito menor, os gram-positivos.

127 A maioria das amostras que não foram pré-incubadas submetidas ao teste da  
128 lactofermentação não apresentaram coágulo (Tabela 3), representando 25 amostras (83,4% do total  
129 analisado), o que indica a ausência de células microbianas (PINTO et al. 2006) por alta eficiência  
130 do processo UHT. Por outro lado, o processo também fez com que nenhuma das amostras  
131 apresentasse coágulos uniformes, ou gelatinosos, o que indicaria a presença de bactérias ácido-  
132 láticas (BAL). Essas bactérias fazem parte da microbiota ideal do leite-cru, e são desejáveis por  
133 estarem relacionadas a efeitos benéficos como ação probiótica e regulação do trânsito intestinal. Já  
134 os outros 16,6% das amostras apresentaram coágulo do tipo esponjoso. Nenhuma das amostras  
135 apresentou coágulo do tipo digerido, característico de micro-organismos psicrotróficos  
136 proteolíticos, em concordância com a baixa contagem bacteriana nas placas analisadas (Tabela 1).

137 As amostras incubadas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias apresentaram resultados semelhantes, sendo  
138 a maioria dos resultados sem coagulação, mas com o dobro de amostras com coágulo esponjoso

139 (10, sendo 7 da marca A e 3 da marca B, representando 33,3% do total), e também com ausência  
140 de coágulos do tipo digerido e gelatinoso. No teste realizado sem incubação, cinco amostras da  
141 marca A apresentaram coágulo do tipo esponjoso.

142 Os coágulos de tipo esponjoso caracterizam a presença de micro-organismos do grupo dos  
143 coliformes (SANTANA et al. 2016), que, através da produção de gases oriundos do seu  
144 metabolismo, formam orifícios no leite coagulado. Essas bactérias não são desejáveis no leite cru,  
145 muito menos no leite processado. Como descrito por PEREIRA et al. (2013), por se tratar de  
146 produtos UHT, é provável que a origem dessa contaminação tenha acontecido pós-processo térmico,  
147 caracterizando falhas no final da produção. Porém, também podem ser provenientes de más  
148 condições higiênicas ao longo da cadeia de produção (ordenha, estocagem e transporte), podendo  
149 atingir o produto através de contaminação cruzada.

150

## 151 **CONCLUSÕES**

152 Diante dos resultados obtidos, o processo UHT utilizado por ambas as marcas se mostrou  
153 eficiente no controle de bactérias psicrótróficas, com crescimento bacteriano em apenas uma das  
154 amostras. Entretanto, os testes de lactofermentação revelam a provável contaminação por  
155 microrganismos mesófilos do grupo dos coliformes em até um terço das amostras pré-incubadas.  
156 Além disso, não houve formação de coágulos gelatinosos em nenhum dos produtos, indicando a  
157 ausência de bactérias ácido-láticas. Essas, por sua vez, são desejáveis no leite-cru e não sobrevivem  
158 ao processo térmico.

159 Portanto, apesar do processo ser efetivo contra bactérias deteriorantes, a indústria de  
160 laticínios pode desprender de medidas para evitar a presença de coliformes, investindo em boas  
161 práticas, higienização correta dos equipamentos utilizados e identificando possíveis pontos de  
162 contaminação dentro do processo de produção.

## REFERÊNCIAS

- 163
- 164
- 165 BALIGNIÈRE, F et al. 2013. Proteolysis of ultra-high temperature-treated casein micelles by AprX  
166 enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilization. International Dairy Journal  
167 31: 55-61.
- 168
- 169 BAUR, C et al. 2015. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms  
170 isolated from raw milk. International Dairy Journal 49: 23-29.
- 171
- 172 BEALES, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives  
173 low pH and osmotic stress: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3:  
174 1-20.
- 175
- 176 BRITO, MAVP. & BRITO, JRF. 2001. PRODUÇÃO DE LEITE E SOCIEDADE: uma análise  
177 crítica da cadeia do leite no Brasil. 1.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ - EDITORA.
- 178
- 179 CHAMPAGNE, CP et al. 1994. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control.  
180 Critical Review in Food Science and Nutrition 34: 1-30.
- 181
- 182 DA SILVA, N et al. 2017. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.  
183 5.ed. São Paulo: Blucher.
- 184
- 185 DAS, S et al. 2015. A low-cost instrumentation system to analyze different types of milk  
186 adulteration. ISA Transactions 56: 268-275.

187

188 DONLAN, RM & COSTERTON, JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant  
189 microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 167-193.

190

191 HASAN, F et al. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbiology  
192 Technology* 39: 235–251.

193

194 MACHADO, SG et al. 2017. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes  
195 responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology* 8:  
196 1-22.

197

198 MANN, EE & WOZNIAK, DJ. 2012. *Pseudomonas* Biofilm Matrix Composition and Niche  
199 Biology. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 893-916.

200

201 MATÉOS, A et al. 2015. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracelullar protease identified  
202 in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT  
203 milk. *International Dairy Journal* 49: 78-88.

204

205 NERO, LA et al. 2017. *Produção, processamento e fiscalização de leite e derivados*. 1.ed. São Paulo:  
206 Ateneu.

207

208 OLIVEIRA, GB et al. 2015. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?  
209 *Brazilian Journal of Microbiology* 46: 313-321.

210

211 PEREIRA, JR et al. 2013. Microbiota Mesófila Aeróbia Contaminante do Leite UHT. Revista do  
212 Instituto de Laticínios Cândido Tostes 68: 25-31.  
213

214 PINTO, CLO et al. 2006. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de  
215 Bactérias Psicotróficas Proteolíticas. Ciência e Tecnologia de Alimentos 26: 645-651.  
216

217 RIBEIRO JÚNIOR, JC. 2017. Micro-organismos deteriorantes do leite: atividade proteolítica e  
218 lipolítica de bactérias psicotróficas e termodúricas mesófilas. Teste (Doutorado em Ciência  
219 Animal). Londrina: UEL. 117p.  
220

221 ROSSI JÚNIOR, OD et al. 2006. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo  
222 de seu processamento. Arquivos do Instituto Biológico 73: 27-32.  
223

224 SAEKI, EK & MATSUMOTO, LS. 2010. Contagem de Mesófilos e Psicotróficos em Amostras  
225 de Leite Pasteurizado e UHT. Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes 65: 29-35.  
226

227 SANTANA, EHW et al. 2016. Análises físico-químicas aplicadas no controle de qualidade do leite  
228 cru. 1.ed. Londrina: UNOPAR Editora.  
229

230 SWANSON, KMJ et al. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of  
231 Foods. 5.ed. Washington: APHA.  
232

233 SØRHAUG, T & STEPANIAK, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy

234 products: Quality aspects. Trends in Food Science & Technology 8: 35-41.

235

236 TAVANO, OL. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology.

237 Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 90: 1-1.

238

239 VON NEUBECK, M et al. 2015. Biodiversity of Refrigerated Raw Milk Microbiota and Their

240 Enzymatic Spoilage Potential. International Journal of Food Microbiology 211: 57-65.

241

242 WESTHOFF, DC & DOUGHERTY, SL. 1981. Characterization of *Bacillus* species isolated from

243 spoiled ultrahigh temperature processed milk. Journal of Dairy Science 64: 572-578.

244

245 **TABELAS E FIGURAS**

246

247 Tabela 1. Contagem de micro-organismos aeróbios psicrotróficos em leites (pré-incubados e não

248 pré-incubados a 36°C, +-1°C, por 7 dias) submetidos à *Ultra High Temperature - UHT*.

249 *Table 1. Aerobial psychrotrophic microorganisms count in preincubated and not preincubated at*

250 *36°C, +-1°C, for 7 days, UHT milk*

UFC/mL	Marcas de Leite UHT	
	A n (%)	B n (%)
<1	29 (96,6)	30 (100,0)
1-25	0 (0,0)	0 (0,0)
26-99	0 (0,0)	0 (0,0)

100-250	0 (0,0)	0 (0,0)
>250	1 (3,4)	0 (0,0)

251 Legenda: A n: amostras de leite UHT da marca “A”; B n: amostras de leite UHT da marca “B”.

252 *Subtitle: A n: brand “A” UHT milk samples; B n: brand “B” UHT milk samples.*

253

254 Tabela 2. Distribuição dos resultados da coloração de Gram de colônia isolada de amostra de leite  
255 UHT, coletadas no comércio de Curitiba-PR e região.

256 *Table 2. Results distribution obtained from Gram staining of colonies isolated from UHT milk*

257 *samples, obtained from local markets at the region of Curitiba-PR.*

Classificação Morfológica de	Marcas de Leite UHT	
	A n (%)	B n (%)
Psicrotróficos Aeróbios		
B -	1 (100,0)	0 (0,0)

258 Legenda: B -: Bacilo Gram negativo; A n: amostras de leite UHT da marca “A”; B n: amostras de  
259 leite UHT da marca “B”.

260 *Subtitle: B-: Gram Negative Bacille; A n: brand “A” UHT milk samples; B n: brand “B” UHT*  
261 *milk samples.*

262

263 Tabela 3. Distribuição dos resultados do teste de lactofermentação sem pré-incubação das  
264 amostras a 36°C ± 1°C por 7 dias

265 *Table 3. Lactofermentation test results distribution of not preincubated at 36°C ± 1°C for 7 days*  
266 *samples*

Forma de	Marcas de Leite UHT	Total n (%)

<b>Coágulos</b>	<b>A n (%)</b>	<b>B n (%)</b>	
Gelatinoso	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Esponjoso	5 (33,3)	0 (0,0)	5 (16,6)
Digerido	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem coágulo	10 (66,7)	15 (100,0)	25 (83,4)

267 Legenda: A n: amostras de leite UHT da marca “A”; B n: amostras de leite UHT da marca “B”.

268 *Subtitle: A n: brand “A” UHT milk samples; B n: brand “B” UHT milk samples.*

269

270 Tabela 4. Distribuição dos resultados do teste de lactofermentação com pré-incubação das  
271 amostras a 36°C ± 1°C por 7 dias

272 *Table 4. Lactofermentation test results distribution of preincubated at 36°C ± 1°C for 7 days*  
273 *samples*

<b>Forma de Coágulos</b>	<b>Marcas de Leite UHT</b>		<b>Total n (%)</b>
	<b>A n (%)</b>	<b>B n (%)</b>	
Gelatinoso	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Esponjoso	7 (46,7)	3 (13,3)	10 (33,3)
Digerido	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem coágulo	8 (53,3)	12 (86,7)	20 (66,7)

274 Legenda: A n: amostras de leite UHT da marca “A”; B n: amostras de leite UHT da marca “B”.

275 *Subtitle: A n: brand “A” UHT milk samples; B n: brand “B” UHT milk samples.*