



Bactérias psicrotróficas e enzimas termorresistentes em leite cru

Psychrotrophic bacteria and thermosist resistant enzymes in raw milk

Kleber Barros Nunes¹, Lívia Ribeiro da Silva², Sybelle Georgia Mesquita da Silva³, Cícero Cerqueira Cavalcanti Neto⁴, Tania Marta Carvalho dos Santos⁵, Yamina Coentro Montaldo⁶

¹Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas, Maceió, +5582999120404, klebernunes09@yahoo.com.br; ²Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, livia.silva@ceca.ufal.br; ³Mestre pelo Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, belle_mesquita21@hotmail.com; Professores do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, ⁴cicerodurao@ig.com.br; ⁵taniamarta2@gmail.com; ⁶ycmzte11@gmail.com

ARTIGO

Recebido: 15/12/2019
Aprovado: 20/12/2019

Palavras-chave:

Gram-negativas
Proteases
Lipases
Pseudomonas
Termodúricos

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho isolar e caracterizar bioquimicamente a microbiota psicrotrófica, bem como avaliar seu poder deteriorador no leite cru refrigerado, armazenado em tanques de expansão, individuais e coletivos, de propriedades das regiões Agreste e Sertão do Estado de Alagoas. Foram analisadas amostras de leite coletadas em 23 tanques individuais e 13 coletivos, onde se verificou a presença de bactérias psicrotróficas nos dois tipos de tanques de refrigeração, sendo um total de 105 isolados bacterianos. Foi detectada a predominância de bactérias psicrotróficas gram-negativas 78,09% (82/105), dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Shigella*, enquanto que as bactérias gram-positivas foram da ordem de 21,90% dos gêneros *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*. *Pseudomonas* foi o gênero predominante com 43,81%. A grande maioria dos isolados bacterianos demonstrou alto poder de produção de enzimas extracelulares – protease, lipase e/ou lecitinase, evidenciando assim potencial deteriorador do leite e derivados. Estatisticamente não foi significativa a diferença de produção enzimática pelos isolados entre tanques individuais e coletivos, não havendo dependência entre o número de isolados bacterianos produtores de enzimas e o tipo de tanque.

ABSTRACT

The goal of this study was the isolation and biochemical characterization of psychrotrophic microbiota, evaluating its deteriorating potential on refrigerated raw milk stored in both individual and collective expansion tanks located in farms from Agreste and Sertão regions of Alagoas State. Milk samples from 23 (individual) and 13 (collective) tanks were analyzed, and the presence of psychrotrophic bacteria was diagnosed in both types of refrigeration tanks, totalizing 105 bacterial isolates. There was a predominance of gram-negative psychrotrophic bacteria 78,09% (82/105) from genus *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Shigella*, whereas gram-positive bacteria represented 21,90% (23/105) of total isolates, from genus *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus*. In general, *Pseudomonas* was the most prevalent genus isolated 43,81% (46/82). The majority of bacterial isolates had high extracellular enzymes production – protease, lipase and/or lecithinase, which evidenced elevate deteriorating potential for milk and its derivatives. There was no significant difference on enzymatic production among isolates or between individual and collective tanks, as well as no dependency between total number of enzymatic producer bacterial isolates and tank type.

INTRODUÇÃO

O leite é constituído de proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos e sais minerais, tornando-se um alimento bastante rico em nutrientes. Dessa forma, sua qualidade é foco de várias discussões dentro da produção leiteira em nosso país. O Brasil em 2015 ocupou o sexto lugar na produção mundial (IBGE, 2015), com cerca de 35 bilhões de

litros, tendo um consumo per capita da ordem de 173,6 litros (CONAB, 2016).

O isolamento e a identificação de microrganismos em leite cru se tornam interessantes do ponto de vista de saúde pública, pois dependendo das espécies isoladas, ações direcionadas podem ser tomadas visando à melhoria de sua qualidade. A deterioração do leite é consequência, sobretudo do crescimento de microrganismos psicrotróficos (TEBALDI et al., 2008).



As bactérias psicotróficas são aquelas que têm a habilidade de se desenvolverem em baixas temperaturas – abaixo de 7°C. Encontram-se amplamente distribuídas na natureza, podendo estar presentes nos mais diversos ambientes, independente do clima ou da estação do ano. A quantidade de bactérias psicotróficas necessárias em um determinado produto para que possa haver alterações e causar problemas está em torno de 10^6 UFCml⁻¹ (PINTO et al., 2006).

No leite, os principais gêneros de bactérias psicotróficas são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Yersinia* e *Pseudomonas*, gram-negativos; *Bacillus*, *Listeria* e *Clostridium*, gram-positivos (HORST, 2006). Destacam-se como termorresistentes os gêneros *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, enquanto que *Clostridium* e *Bacillus* são formadores de esporos (WALSTRA, 2001). Destes, o gênero *Pseudomonas* spp, é o mais frequente (HORST, 2006).

Os micro-organismos são as principais responsáveis pelo deterioramento do leite cru refrigerado e de seus derivados ao produzirem proteases, lipases e lecitinases, as quais hidrolisam a proteína e a gordura do leite. Apesar de a maior parte das bactérias psicotróficas não resistirem ao processo da pasteurização, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, persistindo mesmo ao tratamento UHT, continuando assim em atividade, trazendo grandes prejuízos através de suas ações, destacando variações no sabor e cheiro em diferentes produtos (ARCURI et al., 2008). Estas bactérias também estão relacionadas com intoxicações alimentares após o consumo do leite ou seus derivados.

Objetivou-se com esse trabalho isolar e caracterizar bioquimicamente a microbiota psicotrófica, bem como seu poder de produção de enzimas extracelulares no leite cru refrigerado, armazenado em tanques de expansão, individuais e coletivos, de propriedades das regiões Agreste e Sertão do Estado de Alagoas.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em 23 tanques individuais e 13 tanques coletivos, após homogeneização mecânica programada, em propriedades das regiões do agreste e sertão alagoano, no período de outubro a novembro de 2016. Foram coletadas 72 amostras de leite, duas por tanque, em tubos estéreis de 50 ml, identificadas, acondicionadas e mantidas sob refrigeração em caixas isotérmicas com gelo, sendo transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Para a contagem e o isolamento, diluições das amostras foram plaqueadas em Plate Count Agar (PCA) e incubadas a 7°C por 10 dias. Após a contagem, foram isoladas cinco colônias de cada placa em ágar Nutriente que foram incubadas a 21°C por 24 horas para identificação. Os resultados foram expressos como logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (\log_{10} UFCml⁻¹).

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à morfologia celular, coloração e reação de Gram, coloração de esporos, metabolismo oxidativo e/ou fermentativo da glicose (OF), à produção de oxidase e catalase, ao crescimento em Agar MacConkey, hidrólise da arginina, motilidade, produção de H₂S e indol em meio SIM, Ágar de ferro e Açúcar tríplice

(TSI), teste de Vermelho de metila (VM), teste de Vogues-Proskauer (VP), teste de Citrato, hidrólise da Urease e formação de ácidos a partir de carboidratos.

As características culturais e morfológicas dos isolados foram convertidas em uma matriz binária de presença e ausência. Deste modo, agruparam-se os isolados em um dendrograma de similaridade, gerado por meio do aplicativo computacional PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis), utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard.

Foi realizada a identificação das bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado em nível de gênero conforme o Manual Bergey de Identificação Bacteriana (1994).

Todos os isolados obtidos foram avaliados quanto a sua capacidade de produção de proteases, lipases, e lecitinases. A produção destas enzimas foi avaliada pela formação de halo em torno da colônia e o diâmetro deste foi medido para uma estimativa quantitativa. A produção de enzimas extracelulares foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. A produção de proteases foi determinada em meio ágar leite (Difco, França), suplementado com 5% de leite em pó com incubação a 21 °C por 3 dias. A atividade da lipase extracelular foi avaliada em meio ágar base, suplementado com tributyrin, adicionado de solução de púrpura de bromocresol 1,5%. As placas foram incubadas a 21°C por 3 dias. A detecção de lecitinases foi determinada em ágar TSA, suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo, incubado a 21°C por 3 dias.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram submetidos à análise estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação). Para análise estatística de contagem padrão em placas de psicotróficos, foi feita a transformação logarítmica (\log_{10}) a fim de normalizar a distribuição de frequência. Para avaliação da atividade enzimática foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os testes foram efetuados em triplicata e os dados foram analisados por meio de análise de covariância (ancova) e regressão, utilizando o teste F e comparações das médias utilizando o teste de Fischer, ($p=0,01$). As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa XLSTAT e o Excel 2007 (ADDINSOFT, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de bactérias psicotróficas nas amostras de leite foi similar para os dois tipos de tanques, variando entre 2,60 a 7,48 \log_{10} UFCml⁻¹ e 2,00 a 7,84 \log_{10} UFCml⁻¹ (tanques individuais e coletivos respectivamente). Pinto et al. (2015) encontrou variações semelhantes, indo de 2,3 a 7,00 \log_{10} UFCml⁻¹ em tanques individuais, ao passo que em tanques comunitários, o intervalo de contagem variou de 3,95 a 6,50 \log_{10} UFCml⁻¹.

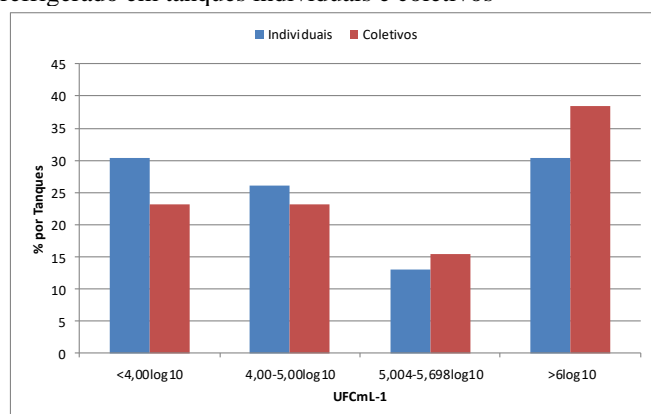
Silva (2003) também encontrou contagens altas de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru coletadas em silos industriais de processadores de leite UHT dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás. Nessas amostras, as contagens de bactérias psicotróficas variaram entre 6,15 e 7,94 \log_{10} UFCml⁻¹, e diferenças significativas foram detectadas em função do Estado e da estação do ano.

Não existem limites estabelecidos por legislação para microrganismos psicotróficos, porém, alguns autores verificaram que alterações bioquímicas se tornam significativas na matéria-prima com contagens superiores a

6,00 log₁₀ UFCml⁻¹ (Pinto et al., 2006). No entanto, outros relatos indicam que estas alterações podem ser percebidas com contagens menores, a partir de 5,00 log₁₀UFCml⁻¹.

Apenas a faixa de contagem de psicotróficos não é suficiente para se ter um panorama da condição dos tanques analisados, desse modo, considerando os índices mostrados por Thomas e Thomas (1973), os tanques individuais e comunitários foram separados em intervalos de contagens. O número de isolados dentro de cada uma das faixas está expresso em termos de porcentagem do total conforme mostra a Fig. 1.

Figura 1. Distribuição em porcentagem da contagem de bactérias psicotróficas (log₁₀ UFCml⁻¹) em leite cru refrigerado em tanques individuais e coletivos



Contagens entre 4,00 e 5,00 log₁₀UFCml⁻¹, indicam a necessidade de melhorias na higiene de ordenha e/ou na higienização dos equipamentos utilizados. Conforme se verifica nesta pesquisa, 30,34% dos tanques individuais e 23,08% dos coletivos estão dentro dos padrões de higiene preconizados. Contrariamente, 38,46% dos tanques coletivos e 30,43% dos individuais apresentaram contagens iguais ou superiores 6Log₁₀UFCml⁻¹, sendo um indício definitivo de condições insatisfatórias de produção ou refrigeração do leite na fazenda.

Das amostras de leite cru refrigerado, foram selecionados 105 isolados bacterianos, havendo predominância de isolados caracterizados como bactérias gram-negativas, 78% (82 isolados) e 22% (23 isolados) gram-positivos. Este resultado está de acordo com outras pesquisas, nas quais esse grupo predomina como contaminantes mais frequentes do leite sob refrigeração (ARCURI et al., 2008).

Considerando a morfologia, a maior parte foi de bastonetes, representando 76,19% dos isolados, os quais 6,25% foram gram-positivos e 93,75% gram-negativos, enquanto que os cocos representaram 20,95% sendo, 18,18% gram-positivos e 81,82% gram-negativos. Outras formas totalizaram 2,86% dos isolados.

A caracterização morfológica de colônias de bactérias, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas. Predominou a forma circular e borda lisa, no entanto, as demais características apresentaram um considerável grau de diferenciação. Todos os isolados apresentaram colônia com diâmetro maior que 1,0 mm, caracterizando-se também por apresentar: 1) formato

circular e borda lisa 86,67%; 2) formato puntiforme e borda lisa 5,71%; 3) colônia granulosa com borda contínua 2,86%; 4) colônia rugosa com borda irregular 2,86%, e; 5) colônia larga com borda irregular 1,90%. Quanto à coloração da colônia, foram obtidos isolados de coloração branca leitosa (86,28%), amarela (8,00%), bege (2,86) e cinza (2,86%). Para os parâmetros elevação e transparência da colônia, os isolados apresentaram distribuição de 86,68% para elevação convexa, 11,42% côncava e 1,90% para elevação achatada, ainda 54% são colônias opacas e 46% são colônias translúcidas.

Os testes que tratam do metabolismo bacteriano são considerados os mais importantes, visto que na maioria das vezes estão relacionados com a presença de enzimas específicas. A pesquisa de catalase e oxidase é indispensável na identificação bacteriana. As duas enzimas estão relacionadas com a proteção contra as formas reativas de oxigênio. A oxidase ou superóxido dismutase (SOD) converte o oxigênio ionizado presente em todos os aeróbios, anaeróbios facultativos e alguns aerotolerantes. De acordo com a resposta ao teste, as bactérias gram-negativas foram classificadas como: aeróbios estritos (catalase+; oxidase+) 13%, anaeróbios facultativos, que utilizam oxigênio como receptor final de elétrons (catalase+; oxidase-), 13%; anaeróbios estritos (catalase-; oxidase-), 65%; anaeróbios facultativos (catalase-; oxidase+)9% que fermentam e não utilizam oxigênio como receptor final de elétrons. Enquanto que as gram-positivas, 26% se caracterizaram como anaeróbios facultativos, que utilizam oxigênio como receptor final de elétrons e 74% aeróbios estritos.

A frequência e o percentual dos gêneros verificados nesta pesquisa podem ser observados na Tab. 1. Dentre os isolados identificados, *Pseudomonas* sp. foi o gênero predominante, com 46 isolados (43,81%), seguido por *Enterobacter* e *Streptococcus*, 15 (14,29%) e 12 isolados (11,43%), respectivamente.

Com relação aos gêneros bacterianos, foi observado similaridade de 73,68% entre os dois tipos de tanque (Coeficiente de Jaccard). A Fig. 2 apresenta a distribuição dos gêneros por tipo de tanque.

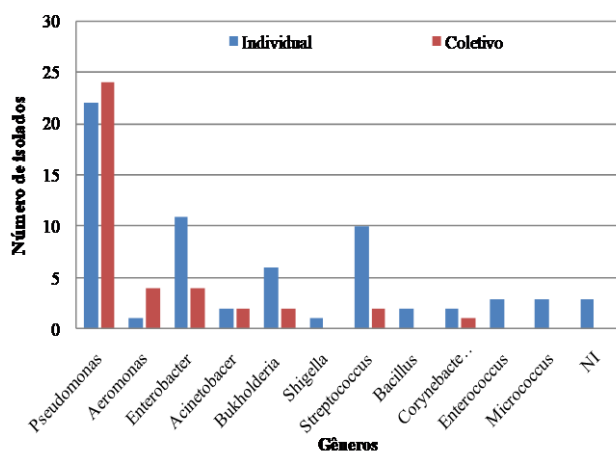
Arcuri et al. (2008), verificaram que de 308 isolados de microrganismos psicotróficos, dos 250 que foram identificados como gram-negativos, a maioria foi identificada como *Pseudomonas* spp., representando 43,2% (108) dos isolados e destas, 87,0% (94) foram da espécie *P. fluorescens*. O mesmo ocorreu com experimento conduzido por Pinto et al. (2006) os quais relataram que dos 153 isolados, 66 (43,14%) pertenciam ao gênero *Pseudomonas* spp.

Também foi alta a contagem de bactérias do gênero *Enterobacter* sp. 15 (14,28%), verificando-se ainda outra enterobacteriaceae, *Shigella* sp. 01 (0,95%), podendo-se justificar seus isolamentos, pelo fato dos tanques de resfriamento estarem próximos aos estábulos, já que estas bactérias já foram isoladas das moscas de estábulo (*Stomoxys calcitrans*) por Moraes et al. (2004). Ávila e Gallo (1996), em seu estudo, também identificaram 14 (46,68%) de 30 isolados bacterianos como sendo do gênero *Enterobacter* sp., os quais foram identificados também por Nörnberg et al. (2010) em estudo no Rio Grande do Sul, com contagens da ordem de 30% dos isolados bacterianos gram-negativos em leite cru refrigerado.

Tabela 1. Frequência e percentual de gêneros e bactérias psicrotróficas identificadas, isoladas de leite cru a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas*

	Gêneros	Número de isolados	% de ocorrência	Grupo * *
Gram -	<i>Pseudomonas</i>	46	43,81	04
	<i>Enterobacter</i>	15	14,29	05
	<i>Aeromonas</i>	05	4,76	05
	<i>Burkholderia</i>	08	7,62	04
	<i>Acinetobacter</i>	04	3,81	04
	<i>Shigella</i>	01	0,95	05
	Não identificado	03	2,86	-
Gram +	<i>Streptococcus</i>	12	11,43	17
	<i>Corynebacterium</i>	03	2,86	20
	<i>Enterococcus</i>	03	2,86	17
	<i>Micrococcus</i>	03	2,86	17
	<i>Bacillus</i>	02	1,90	18
	Total	105	100	

*Testes bioquímicos, **Conforme Manual Bergey

Figura 2. Contagem de isolados por gêneros bacterianos psicrotróficos, presentes no leite cru refrigerado coletado a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas por tipo de tanque (individual e coletivo)

Apesar do baixo número de isolados, o gênero *Shigella* sp., assume grande importância por ser altamente patogênico, sendo responsável pela shigelose ou doença bacilar, infecção alimentar que acomete principalmente crianças entre um e 10 anos (MARQUES, 2008). Água contaminada com material fecal e os manipuladores, são responsáveis por sua presença em alimentos, denotando falhas nas medidas de higiene.

A presença de *Enterococcus* sp. é comum na microbiota do leite cru, contudo, no Brasil, não são definidos padrões quanto a sua quantificação no produto. No presente estudo obteve-se 03 (2,86%) isolados bacterianos pertencentes a este gênero, indicando falhas na obtenção higiênica do leite por ser um microrganismo indicador de contaminação fecal nos alimentos, multiplicando-se no ambiente, e abundantes nas fezes animais (MENEZES et al., 2015). *Enterococcus* sp. também foi demonstrado por outros autores em amostras de leite, como os relatados por Holm et al. (2004), que verificaram contagens de 5,00 log₁₀UFCml⁻¹ isolados de tanques na Dinamarca, e Tebaldi et al. (2008), que isolaram estes microrganismos em leite cru de propriedades leiteiras no município de Boa Esperança – MG, com contagens chegando até 7,23 log₁₀UFCml⁻¹.

Também foram isolados microrganismos termofílicos, aqueles com capacidade de sobreviverem aos tratamentos

térmicos (pasteurização), dentre eles: *Streptococcus* sp. 12 (11,43%), *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* ssp., e *Micrococcus* sp., 3 (2,86%) cada, além de bactérias do gênero *Bacillus* sp., 2 (1,90%), sendo de grande importância por desenvolverem ação deteriorante do leite pasteurizado, e por serem termorresistentes, continuando com a produção de enzimas hidrolíticas que podem estar associadas fortemente à diminuição da vida útil do leite e seus derivados.

Várias espécies de *Bacillus* são capazes de produzir esporos altamente resistentes ao calor. Segundo Scheldeman et al. (2006), alguns bacilos sobrevivem ao tratamento UHT (2-5s, 140-145°C), desempenhando um papel na deterioração do leite, acarretado pelo seu desenvolvimento posterior ao tratamento térmico. A deterioração do leite por espécies de *Bacillus* é proporcionada por suas enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis.

Ribeiro Júnior et al. (2015), verificaram contagens médias de 3,54 log₁₀UFCml⁻¹ de termofílicos psicrotróficos ao analisarem 20 amostras de leite cru refrigerado no norte do Paraná. Pinto et al. (2015), também isolaram bactérias dos gêneros *Enterococcus* sp. e *Bacillus* sp. de amostras de leite cru refrigerado.

A presença de bactérias do gênero *Bacillus* em tanques de refrigeração desperta o interesse não só pela característica deteriorante, mas também pela possibilidade de ocorrerem espécies patogênicas como *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* que podem produzir toxinas responsáveis por quadros de gastroenterites em seres humanos (Jay, 2005).

Streptococcus e *Corynebacterium* no leite podem indicar a presença de animais doentes no rebanho. Segundo Bizari (2002), 90% das mastites são ocasionadas por bactérias do gênero *Streptococcus*. Estes microrganismos podem ser encontrados em leite proveniente de vacas com mastite.

Ainda foram isoladas bactérias gram-negativas patogênicas dos gêneros *Acinetobacter* sp. 4 (3,81%), *Burkholderia* sp. 8 (7,61%) e *Aeromonas* sp. 5 (4,76%), como verificados em estudo por Pinto et al. (2015), Nörnberg, (2009) e Arcuri et al. (2008), onde os autores demonstraram seus altos poderes deteriorantes através das atividades lipolíticas e proteolíticas.

Carneiro e Rossi Júnior (2006), analisando possíveis pontos de contaminação e disseminação de bactérias do gênero *Aeromonas* sp. na linha de produção, constataram ser positivas em 90% das amostras de leite cru, 30% das de leite

da saída do pasteurizador, 40% nas de leite do tanque de abastecimento da máquina de empacotar e 25% das amostras de leite pronto para consumo. Ainda segundo os autores, este gênero possui capacidade de sobreviver e multiplicar em alimentos mantidos sob refrigeração, como o leite, e, várias cepas são capazes de produzir toxinas. Sua presença em leite pasteurizado, particularmente no tipo A, pode conferir a este produto um sério risco à saúde.

A análise estatística do número de isolados proteolíticos, lipolíticos e lecitinolíticos, não detectou diferenças significativas entre tanques individuais e coletivos, (teste $F < 0,0001$), indicando que não houve dependência entre o número de isolados bacterianos produtores de enzimas e o tipo de tanque.

Em sua grande maioria, os psicotróficos são eliminados pelos tratamentos térmicos de beneficiamento do leite. A relevância desses microrganismos encontra-se na sua alta capacidade de síntese de enzimas exógenas ou extracelulares (proteases e lipases) termoestáveis, frente aos diferentes binômios empregados no beneficiamento do leite. A presença de psicotróficos em concentrações superiores a $6,00 \log_{10} \text{UFCml}^{-1}$ é correlacionada com a produção dessas enzimas em concentrações significativas e com os produtos resultantes da proteólise e lipólise (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Quanto à produção de enzimas, não foram detectadas diferenças significativas entre isolados gram-positivos e gram-negativos. Os psicotróficos gram-positivos identificados neste trabalho apresentaram potencial para produção de proteases e lipases, evidenciando suas

características deterioradoras, verificando-se que 15 (65,21%) isolados testados produziram proteases e 9 (39,13%), produziram lipases. Lecitinase foi expressa por 4 (17,39%) isolados. Quanto aos gram-negativos verificou-se que 65 (79,27%) produziram proteases, 62 (75,61%) produziram lipases e 47 (57,32 %) lecitinase. A produção de lecitinase foi observada em menor número em ambos os grupos.

Diversos estudos corroboram com esses resultados, dentre eles os citados por Arcuri (2003), que afirmam que as proteases e as lipases estão diretamente associadas à deterioração do leite e derivados, tendo ainda a lecitinase também relacionada, porém em menor escala.

A Tabela 2 apresenta o percentual de isolados produtores de enzimas em cada gênero. Dentre os isolados gram-positivos, bactérias dos gêneros *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp. e *Enterococcus* sp., desenvolveram atividades proteolíticas, lipolíticas e lecitinolíticas, variando apenas suas proporções. Em contra-ponto, isolados do gênero *Streptococcus* sp., apresentaram apenas atividade proteolítica, enquanto que os *Micrococcus* sp., foram capazes de ações proteolíticas e lipolíticas. Diferentemente do que foi relatado por Pinto et al. (2015), que verificaram em sua pesquisa que as bactérias gram-positivas foram predominantemente proteolíticas, apresentando baixas proporções de isolados que produziram lipases e lecitinases. Ribeiro Júnior et al. (2015), em estudo com bactérias gram-positivas termodúricas, utilizando 347 colônias isoladas, demonstraram que 142 (40,1%) apresentaram atividade enzimática de proteólise.

Tabela 2. Produção de enzimas extracelulares por bactérias psicotróficas isoladas de leite cru refrigerado, coletado a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas

	Gêneros	% de isolados produtores de enzimas		
		Protease	Lipase	Lectinase
Gram+	<i>Streptococcus</i>	41,66	-	-
	<i>Corynebacterium</i>	100,00	100,00	66,67
	<i>Enterococcus</i>	100,00	66,67	66,67
	<i>Micrococcus</i>	66,67	66,67	-
	<i>Bacillus</i>	100,00	100,00	100,00
Gram -	<i>Pseudomonas</i>	97,82	93,47	82,60
	<i>Enterobacter</i>	33,30	-	-
	<i>Aeromonas</i>	100,00	100,00	40,00
	<i>Burkholderia</i>	87,50	87,50	75,00
	<i>Acinetobacter</i>	-	50,00	-
	<i>Shigella</i>	-	-	-
	Não identificado	100,00	100,00	33,33

Dentre os isolados gram-negativos, os gêneros *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. e *Burkholderia* sp., apresentaram o maior número de isolados com atividade enzimática (Tab. 2). Entretanto, *Enterobacter* sp. e *Acinetobacter* sp., apresentaram apenas atividade proteolítica e lipolítica, respectivamente, contrastando com bactérias do gênero *Shigella* sp., que não desenvolveu nenhuma atividade enzimática. Wang e Jayarao (2001), em seus estudos também observaram formação de proteases por *Pseudomonas* sp. em 80,91% dos isolados bacterianos, e 58% destes tiveram atividade lipolítica. De maneira distinta, após analisarem 33 isolados do gênero *Pseudomonas* sp., Hantsis-Zacharov e Halpern (2007), verificaram que a lipólise foi maior entre eles, atingindo uma proporção de 74%.

No presente estudo, o número de isolados bacterianos psicotróficos proteolíticos e lipolíticos, foi maior em tanques individuais, contrastando com o relatado por Catanio et al. (2013), os quais verificaram que estes haviam sido em maior número nos tanques coletivos. Os autores ainda afirmam que um reduzido número de bactérias psicotróficas, é suficiente para a produção de enzimas extracelulares, maiores responsáveis pelas alterações dos produtos lácteos.

Neste estudo, os isolados do gênero *Pseudomonas* sp. apresentaram atividades de proteólise relacionadas com atividades lipolíticas e de lecitinase, fato também verificado por Pinto et al. (2015).

A avaliação quantitativa da produção de proteases, lipases e lecitinases, que é expressa pela hidrólise da caseína e

dos lipídios do leite através da formação do halo em volta da colônia de crescimento, pode ser visualizada na Tab. 3. Conforme se verifica, os isolados do gênero *Bacillus* apresentaram maiores halos para as três enzimas, seguido por *Pseudomonas* e *Corynebacterium*, maiores halos e, portanto, maior potencial deteriorador.

Tabela 3. Atividade proteolítica, lipolítica e lecitinolítica por bactérias psicrotólicas isoladas de leite cru refrigerado, coletado a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas, incubadas a 21°C*

Gêneros	Prot24	Prot48	Prot72	Lip24	Lip48	Lip 72	Lec24	Lec48	Lec72
<i>Bacillus</i>	10,144 a	18,787 a	25,204 a	9,644 a	11,847 a	16,759 a	3,333 a	7,778 a	15,921 a
<i>Pseudomonas</i>	5,364 b	13,213 b	19,782 ab	2,378 cd	13,167 a	18,762 a	0,703 b	1,787 bc	3,571 bc
<i>Corynebacterium</i>	3,381 cd	9,985 bc	15,235 bc	2,881 bc	15,949 a	15,420 a	0,000 b	1,926 bc	4,196 b
<i>Bukholderia</i>	4,481 bc	7,255 cd	12,796 c	3,731 bc	4,611 bc	4,741 bc	0,583 b	1,847 bc	3,204 bc
NI	3,301 cd	8,824 cd	13,296 c	4,023 b	6,486 b	7,963 b	0,667 b	1,000 cd	1,079 cd
<i>Enterococcus</i>	1,285 e	6,127 cde	11,877 c	1,230 de	4,051 bc	8,802 b	0,667 b	2,852 b	4,471 b
<i>Aeromonas</i>	3,323 cd	4,846 de	5,896 d	1,023 de	2,553 bc	4,141 bc	0,667 b	0,756 cd	1,279 cd
<i>Micrococcus</i>	2,063 de	3,127 ef	4,210 d	0,785 de	3,384 bc	3,914 bc	-	-	-
<i>Acitenobacter</i>	0,190 e	0,380 f	0,630 d	1,023 de	1,403 c	2,991 bc	-	-	-
<i>Eenterobacter</i>	0,190 e	0,491 f	1,096 d	0,068 e	0,264 c	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	0,190 e	0,380 f	0,630 d	0,023 e	0,153 c	-	0,017 b	-	-
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pr> F	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Fischer (P<0,01)

CONCLUSÃO

No leite cru refrigerado do Agreste e Sertão de Alagoas há presença de altas contagens de bactérias psicrotólicas, indicando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

REFERÊNCIAS

AAKU, E. N.; COLLISON, E. K.; GASHE, B. A.; MPUCHANE, S. Microbiological quality of Milk from two processing plants in Gaborone Botswana. *Food Control*, v.15 n. 3, p. 181-186, 2004.

ADDINSOFT XLStat: software for statistical analysis. Versão 2007.8. Paris, 2007. 1 CD-ROM.

ARCURI, E. F. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotólicas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotólicas 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*. Juiz de Fora: Templo Gráfica, p.105-115. 2003.

ÁVILLA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba - SP. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 159-163, 1996.

BERGEYS' Manual Determinative Bacteriology. 9 ed. Baltimore: Willian & Wilkins, 1994. 787p.

BIZARI, P. A. Eficiência da contagem microscópica da matéria-prima utilizada no processamento de leite UAT* (*ultra alta temperatura). 2002. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

CARNEIRO, M. S.; ROSSI JUNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.73, n.3, p.271-276, 2006.

CATANIO, F. S.; INAY, O. M.; SILVA, A. S.; PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; BELOTI, V.; COSTA, M. R.; SOUZA, C. H. B.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Qualidade do leite cru refrigerado de uma planta de processamento, no norte do Paraná, após a implementação das mudanças impostas pela NI 62 de 2011. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6 Supl 2, p. 3171-3180, 2013.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. *Perspectivas para a agropecuária*. v.4. Safra 2016/2017 Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_13_09_06_46_perspectivas_da_agropecuaria_2016-17_digital.pdf> Acesso em: 10 julho 2017

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw Milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.

HOLM, C.; JEPSEN, L.; LARSEN, M.; JESPERSEN, L. Predominant microflora of down graded danish bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, v.87,n.5, p.1151-1157, 2004.

HORST, J. A. Impacto da refrigeração na contagem bacteriana do leite. In: MESQUITA, A. J; DURR, J. W.; COELHO, K. O. *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento, v.1, p.163-174, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Pecuária Municipal 2015* Disponível em:<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/pm_2015_v43_br.pdf> Acesso em: 10 julho 2017

JAY. J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed Porto Alegre: Artmed, p. 711. 2005.

- MARQUES, S. C. Caracterização bioquímica de bactérias psicotróficas de tanques de refrigeração de leite e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescense* *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável. 2008. 58 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.
- MENEZES, I. R.; ALMEIDA, A. C.; MORÃO, R. P.; REIS, S. V.; SANTOS, C. A.; LOPES, I. L. N. Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 22, n. 1, p. 58-63. 2015.
- MORAES, A. P. R. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.13, n. 4, p. 143-149, 2004.
- NÖRNBERG, M. F. B. L. Atividade Proteolítica, aderência e produção de biofilmes por micro-organismos psicotróficos em leite bovino. 2009. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Porto Alegre, RS, 2009.
- NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N. TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacterial isolated from refrigerate draw milk. International Journal of Dairy Technology, v. 63, n.1, p. 41-46, 2010.
- PINTO, C. L. O.; MACHADO, S. G.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identification of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw Milk and characterization of its spoilage potential. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.
- PINTO, C. L. O; MARTINS, M. L.; VANETTI, M, C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.26, n.3, p. 645-651, 2006.
- PINTO, U. M. *Quorumsensing* em bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite. 70p. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, MG. 2005
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; BELOTI, V. Quality of milk produced by small and large dairy producers. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 36, n. 2, p. 883-888, 2015.
- SCHELDEMAN, P., HERMAN, L., FOSTER, S., HEYNDRIKX, M. *Bacillus sporo thermodurans* and other highly heat-resistant sporeformers in milk. Journal Applied Microbiology, v. 101, p.542–555, 2006.
- SILVA, P. H. F. Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação. 2003. 147 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28,n.3, p. 753-760, 2008.
- THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. 1. Dairy Industries, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973
- VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 25, n.4, p. 698-704, 2005.
- WALSTRA, P. Ciencia de La leche y tecnología de los productos lácteos. Zaragoza: Acribia; 730p. 2001.
- WANG. L; JAYARAO, B. M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank Milk. Journal of Dairy Science, v. 84, n.6, p. 1421-1429, 2001.