

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

AUDENICE MIRANDA DE OLIVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU EM TANQUES DE  
RESFRIAMENTO COLETIVOS E EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE  
PREVALENTES EM RONDÔNIA**

ROLIM DE MOURA  
2018

AUDENICE MIRANDA DE OLIVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU EM TANQUES DE  
RESFRIAMENTO COLETIVOS E EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE  
PREVALENTES EM RONDÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Ambientais, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestra em Ciências Ambientais,  
sob a orientação da Dra. Juliana Alves Dias

ROLIM DE MOURA  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Fundação Universidade Federal de Rondônia  
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

---

O482q Oliveira, Audenice Miranda de.

Qualidade microbiológica do leite cru em tanques de resfriamento coletivos e em sistemas de produção de leite prevalentes em Rondônia / Audenice Miranda de Oliveira. -- Rolim de Moura, RO, 2018.

67 f. : il.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Alves Dias

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Ambientais) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Bactérias deteriorantes. 2.Pontos de contaminação. 3.Tanques de resfriamento coletivos. I. Dias, Juliana Alves. II. Título.

CDU 637.13

AUDENICE MIRANDA DE OLIVEIRA

**Qualidade microbiológica do leite cru em tanques de resfriamento coletivos e em sistemas de produção de leite prevalentes em Rondônia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Ambientais, sob a orientação da Profa. Dra. Juliana Alves Dias

APROVADA: 31/07/2018



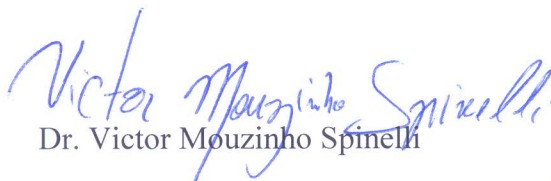
Profa. Dra. Juliana Alves Dias

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Orientadora)



Profa. Dra. Elisabete Takiuchi

Universidade Federal do Paraná (Membro Externo)



Dr. Victor Mouzinho Spinelli

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Membro Externo)

Dedico este trabalho a minha mãe, irmã e filhos (Felipe e Jéssica) pelo apoio incondicional e incentivo aos meus estudos. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus.

À minha família.

À Dra. Juliana Alves Dias, para mim é uma imensa honra tê-la como orientadora. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência. Você é um exemplo de simplicidade e competência. Admiro sua dedicação e amor ao trabalho, sempre preocupada não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano.

Aos membros da banca examinadora Dra. Elisabete Takiuchi e Dr. Victor Mouzinho Spinelli pela disponibilidade e contribuições no trabalho.

À Profa. Dra. Vanerli Beloti e Dr. Ronaldo Tamanini pelas contribuições em todas as etapas do trabalho.

A todos os professores do PCGA, em especial ao Dr. José Roberto Vieira Junior.

Aos funcionários da Embrapa pelo apoio e incentivo, em especial ao Guilherme, Luzia, Marcelo, Marlúcia, Ricardo e Simplício.

Aos colegas do Laboratório de Qualidade do Leite Dhielson, Milena, Naíle, Ivanete, Josiluce, e em especial a Stefany Cristina.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia Aline, Jessica e Simone

À minha amiga Carla Augusta Menezes.

À Universidade Federal de Rondônia – UNIR, em especial ao programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Rondônia pela oportunidade de execução do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Rondônia de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERO) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que participaram direta ou indiretamente desta conquista. Gratidão!

Ninguém é tão grande que não possa aprender,  
nem tão pequeno que não possa ensinar (Esopo)



## RESUMO

A qualidade microbiológica do leite resulta entre outros fatores, das condições de manejo da ordenha e de estocagem e armazenamento da matéria-prima. Considerando a importância da cadeia produtiva do leite para o Estado de Rondônia, a baixa qualidade microbiológica observada nos estudos previamente realizados e a diversidade de micro-organismos deletérios ao leite, este estudo teve o objetivo de quantificar os micro-organismos deteriorantes em pontos de contaminação durante a ordenha de quatro propriedades que representam as características de manejo e instalações predominantes no estado e avaliar a qualidade microbiológica do leite armazenado em tanques de resfriamento coletivos. Para isso foram avaliados 17 pontos de contaminação em cada propriedade e 23 tanques de resfriamento coletivos. Para a pesquisa dos micro-organismos, procedeu-se a diluição decimal seriada da amostra. Para a contagem dos micro-organismos utilizou-se semeadura em duplicata de 1 mL em placas de Petrifilm® AC aeróbios mesófilos e Petrifilm® EC coliformes totais de acordo com o fabricante. Para a contagem de psicotróficos e termodúricos psicotróficos, as amostras foram semeadas em duplicata pelo método de semeadura em superfície, em ágar padrão leite a 10%. Três propriedades adotavam a ordenha manual e uma ordenha mecânica balde ao pé. A média da contagem em baldes/latões e tetos foi de  $2,4 \times 10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>,  $1,3 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $2,7 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>,  $8,2 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> para aeróbios mesófilos e coliformes totais respectivamente. Dos 23 tanques avaliados, 65,2% apresentaram CTB acima de 300.000 UFC/mL. Nos tanques coletivos, a mediana da contagem de mesófilos, psicotróficos, psicotróficos proteolíticos, coliformes, termodúricos mesófilos e psicotróficos foram respectivamente  $2,8 \times 10^5$  UFC/mL,  $6,8 \times 10^5$  UFC/mL,  $4,6 \times 10^5$  UFC/mL,  $2,0 \times 10^4$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL,  $1,3 \times 10^3$  UFC/mL. Observou-se altas contagens de micro-organismos deteriorantes em tanques coletivos, e que os utensílios (baldes/latões) e tetos dos animais foram os pontos críticos de contaminação de micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes durante a ordenha. Os resultados demonstram a importância da adoção de boas práticas de ordenha e do resfriamento adequado leite, e que a lavagem adequada de baldes e latões e a desinfecção dos tetos antes da ordenha devem ser priorizadas a fim de reduzir/eliminar a contaminação microbiológica e melhorar a qualidade e segurança da matéria-prima.

**Palavras-chave:** Bactérias deteriorantes. Pontos de contaminação. Tanques de resfriamento coletivos.

## ABSTRACT

The microbiological quality of the milk results, among other factors, from the management conditions of the milking and storage of the raw material. Considering the importance of the milk production chain for the State of Rondônia, the low microbiological quality observed in previous studies and the diversity of deleterious microorganisms in milk. This study had the objective of quantifying the deteriorating microorganisms at points of contamination during the milking of four properties that represent the management characteristics and predominant facilities in the state and to evaluate the microbiological quality of the milk stored in collective cooling tanks. For this, 17 contamination points were evaluated in each property and 23 collective cooling tanks. For the research of the microorganisms, the serial decimal dilution of the samples was carried out. For counting the microorganisms, used sowing in duplicate of 1 ml in plates of Petrifilm® AC aerobic mesophiles and Petrifilm® EC total coliforms according to the manufacturer. For the counting of psychrotrophic and psychrotrophic thermotolerants, the samples were seeded in duplicate by the surface sowing method, in standard 10% milk agar. Three properties adopted manual milking and milking mechanical with bucket to the foot. The average buckets/brasses and ceiling count was  $2.4 \times 10^8$  CFU/cm<sup>2</sup>,  $1.3 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup> and  $2.7 \times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup>,  $8.2 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> for total mesophyll aerobes and total coliforms respectively. Of the 23 tanks evaluated, 65.2% presented CTBs above 300.000 UFC/mL. In collective cooling tanks, the median mesophilic, psychrotrophic, proteolytic, coliform, thermophilic, mesophilic and psychrotrophic counts were respectively  $2.8 \times 10^5$  UFC/mL,  $6.8 \times 10^5$  UFC/mL,  $4.6 \times 10^5$  UFC/mL,  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL,  $1.5 \times 10^3$  UFC/mL,  $1.3 \times 10^3$  UFC/mL respectively. There were high counts of deteriorating microorganisms in collective tanks, and the utensils (buckets/brasses) and ceilings of the animals were the critical contamination points of aerobic mesophilic and coliform microorganisms during milking. The results demonstrate the importance of adopting good milking practices and adequate milk cooling, and that proper washing of buckets and brasses and disinfection of ceilings prior to milking should be prioritized in order to reduce/eliminate microbiological contamination and improve quality and safety of the raw material.

**Keywords:** Deteriorating Bacteria. Points of Contamination. Collective Cooling Tanks.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Produção de leite em milhões de litros em Rondônia e nas principais microrregiões produtoras de leite do estado. .... 15
- Figura 2** - Distribuição dos resultados de micro-organismos mesófilos (A), psicrotróficos (B) e coliformes (C) em amostras de leite de tanques coletivos de acordo com o tipo de entrega do leite no tanque, microrregiões de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017. .... 62

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Requisitos microbiológicos e de contagem de células somáticas do leite cru refrigerado para as regiões Norte/Nordeste de acordo com a Instrução Normativa n° 62 atualizado pela Instrução Normativa n° 7..... 17
- Tabela 2** - Características de manejo e instalações das propriedades avaliadas, Rondônia, 2017..... 38
- Tabela 3** - Contagens médias de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), psicrotróficos (P), psicrotróficos proteolíticos (PP), termodúricos mesófilos (TM) e temodúricos psicrotróficos (TP) em amostras dos primeiros jatos de leite e leite total de quatro propriedades, Rondônia, 2017..... 41
- Tabela 4** - Contagens médias de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), psicrotróficos (P) e psicrotróficos proteolíticos (PP) em água de uso, tetos, mãos do ordenhador, equipamentos e utensílios de ordenha, de quatro propriedades, Rondônia, 2017. .... 41
- Tabela 5** - Patógenos da mastite isolados em amostras de leite de vacas em lactação nas quatro propriedades avaliadas, Rondônia, 2017. .... 43
- Tabela 6** - Características gerais dos tanques de resfriamento coletivos avaliados, microrregião de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017. .... 55
- Tabela 7** - Distribuição das variáveis relacionadas às características gerais e logística de resfriamento dos tanques de resfriamento avaliados, microrregião de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017..... 56
- Tabela 8** - Variáveis relacionadas à limpeza e manutenção, logística de resfriamento do leite e das análises de amostras de leite realizadas em tanques coletivos, microrregião de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017. .... 57
- Tabela 9** - Distribuição dos resultados da contagem total de bactérias (UFC/mL\*1000) e contagem de células somáticas (céls/mL\*1000) de amostras de leite armazenado em tanques de resfriamento coletivos, microrregiões de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017..... 61
- Tabela 10**-Distribuição dos resultados dos micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, coliformes, *E. coli*, termodúricos mesófilos e psicrotróficos em amostras de leite de tanques de resfriamento coletivos, microrregiões de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017.....61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Aeróbios mesófilos
CB	<i>Corynebacterium bovis</i>
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CT	Coliformes Totais
CTB	Contagem Total de Bactérias
EC	<i>Escherichia coli</i>
IDARON	Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia
IN 7	Instrução Normativa 7
IN 51	Instrução Normativa 51
IN 62	Instrução Normativa 62
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMC	<i>National Mastitis Council</i>
P	Psicrotróficos
PCA	Ágar padrão de contagem
PP	Psicrotróficos proteolíticos
RBQL	Rede Brasileira de Controle de Qualidade do Leite
SCN	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>
SCP	<i>Staphylococcus coagulase positivo</i>
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
STEN	<i>Streptococcus esculina</i> negativo
STEP	<i>Streptococcus esculina</i> positivo
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>1.1 Produção de Leite no Brasil e Rondônia</b> .....	15
<b>1.2 Qualidade do Leite: Legislação e indicadores</b> .....	16
<b>1.3 Qualidade microbiológica do leite cru: Indicadores e situação epidemiológica em Rondônia</b> .....	17
<b>1.4 Microbiota deteriorante do leite cru: Micro-organismos e pontos de contaminação</b> .....	19
<i>1.4.1 Aeróbios mesófilos</i> .....	19
<i>1.4.2 Psicrotróficos</i> .....	20
<i>1.4.3 Coliformes</i> .....	20
<i>1.4.4 Termodúricos</i> .....	21
<i>1.4.5 Pontos de contaminação do leite cru</i> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	29
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	29
<b>3 PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE PREVALENTES EM RONDÔNIA</b> .....	30
<b>RESUMO</b> .....	30
<b>ABSTRACT</b> .....	31
<b>3.1 Introdução</b> .....	32
<b>3.2 Material e Métodos</b> .....	33
<i>3.2.1 Local e população do estudo</i> .....	33
<i>3.2.2 Identificação dos pontos críticos de contaminação microbiológica do leite cru</i> .....	33
<i>3.2.3 Avaliação da sanidade da glândula mamária</i> .....	35
<i>3.2.4 Análise dos dados</i> .....	36
<b>3.3 Resultados e Discussão</b> .....	36
<i>3.3.1 Caracterização das propriedades</i> .....	36
<i>3.3.2 Avaliação dos pontos de contaminação do leite cru</i> .....	38
<i>3.3.3 Avaliação da sanidade da glândula mamária</i> .....	42
<b>3.4 Conclusões</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>4 MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES DO LEITE ARMAZENADO EM TANQUES DE RESFRIAMENTO COLETIVOS DE RONDÔNIA</b> .....	49

<b>RESUMO</b> .....	49
<b>ABSTRACT</b> .....	50
<b>4.1 Introdução</b> .....	51
<b>4.2 Material e Métodos</b> .....	52
<i>4.2.1 Locais e período do estudo</i> .....	52
<i>4.2.2 Coleta das amostras e dados</i> .....	52
<i>4.2.3 Diagnóstico microbiológico e indicadores higiênico-sanitário</i> .....	53
<i>4.2.4 Análise dos dados</i> .....	53
<b>4.3 Resultados e Discussão</b> .....	54
<i>4.3.1 Caracterização dos tanques de resfriamento coletivos</i> .....	54
<i>4.3.2 Pesquisa de micro-organismos deteriorantes e indicadores de qualidade do leite</i>	58
<b>4.4 Conclusões</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>5 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	67

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

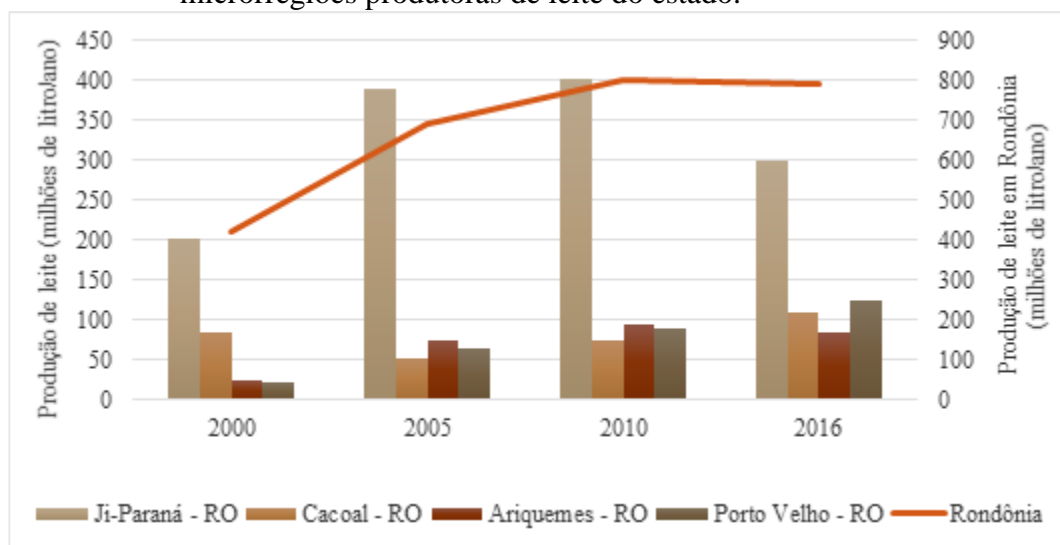
### 1.1 Produção de Leite no Brasil e Rondônia

A produção de leite no Brasil em 2016 foi de 33,62 bilhões de litros, o que coloca o país em quinta posição no *ranking* mundial em produção, atrás apenas da União Europeia, Estados Unidos, Índia e China (IBGE, 2016). No Brasil 5.505 municípios apresentaram produção de leite, e teve o terceiro maior efetivo de vacas leiteiras em 2016.

A pecuária leiteira em Rondônia teve seu início na década de 70, assim como os ciclos econômicos e ocupação do território através da implementação de políticas de integração adotada no território amazônico. Esse fato estabeleceu o modelo produtivo local, centralização da produção de leite na microrregião de Ji-Paraná e progresso da atividade no estado (CARVALHO, 2012).

Rondônia é o nono maior produtor de leite do Brasil com uma produção de 790.947 milhões de litros em 2016. A microrregião de Ji-Paraná é a principal bacia leiteira do estado com produção em 2016 de 298.497 milhões de litros, seguida pelas microrregiões de Porto Velho e Cacoal com 123.954 milhões de litros e 110.141 milhões de litros, respectivamente (IBGE, 2016). Os dados de produção de leite de Rondônia e das principais microrregiões estão apresentados na Figura 1.

**Figura 1** - Produção de leite em milhões de litros em Rondônia e nas principais microrregiões produtoras de leite do estado.



Fonte: IBGE, 2016

A produção de leite para o estado de Rondônia possui importância socioeconômica e constitui uma importante fonte de geração e distribuição de renda, pois grande parte da produção é proveniente da agricultura familiar com destaque para assentados da reforma agrária



e comunidades tradicionais (DIAS et al., 2013). O perfil dos produtores do estado, é caracterizado por pequenos produtores com idade média de 49 anos e provenientes de outras localidades do país (SEBRAE, 2015).

O parque industrial instalado em Rondônia é o maior da região Norte. O estado possui 43 indústrias com Serviço de Inspeção Federal (MAPA, 2017) e 23 com Serviço de Inspeção Estadual (IDARON, 2016). De acordo com dados do Sebrae (2015), 94,3 % do leite produzido no estado é comercializado para laticínios e 75% é processado e comercializado para outros estados, destacando os estados de São Paulo e Amazonas.

## **1.2 Qualidade do Leite: Legislação e indicadores**

Na década de 90, foram observadas transformações em diferentes setores produtivos, incluindo o agronegócio do leite. No período de 1990 a 2015 a produção de leite no Brasil passou de 14,4 bilhões de litros para 35 bilhões de litros (VILELA et al., 2017). Conseqüentemente, com o aumento da produção brasileira, surge a intensificação da informalidade do leite e a necessidade de aperfeiçoamento da legislação para combater fraudes, adulterações e falsificações no setor lácteo (SANTANA; FAGNANI, 2014).

Diante ao exposto o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e as Universidades constituíram um grupo de trabalho, o qual resultou na elaboração do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), que teve como objetivo determinar padrões mínimos para garantia da qualidade do leite. Em 2002, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº 51 (IN51), aprovando os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e Transporte a Granel (BRASIL, 2002).

A qualidade do leite é avaliada por parâmetros de composição (gordura, proteína, extrato seco desengordurado) e por padrões higiênico-sanitários que refletem a saúde dos animais, com ênfase na mastite, a ausência de resíduos químicos e a obtenção e o armazenamento do leite em condições adequadas de higiene e refrigeração. No aspecto higiênico-sanitário, dois parâmetros são universalmente adotados: a contagem total de bactérias (CTB) e a contagem de células somáticas (CCS).

A IN51 determinou que as amostras de leite deveriam ser encaminhadas mensalmente para análise dos indicadores de qualidade do leite a laboratórios pertencentes à Rede Brasileira

de Laboratórios de Qualidade do Leite (RBQL). A análise dos resultados das análises oficiais realizadas no período de 2005 a 2009 demonstrou que, o percentual de amostras de leite que atenderam os limites de CCS e CTB não sofreram alterações significativas desde o início da vigência da IN51 (MAPA, 2011). Neste contexto, a IN51 foi atualizada pela Instrução Normativa nº 62 (IN62) (BRASIL, 2011) que determinou novos prazos para o atendimento dos parâmetros higiênico-sanitários. Entretanto, os prazos foram novamente prorrogados por mais dois anos, pela publicação da Instrução Normativa nº 7 (IN7) (BRASIL, 2016). A tabela 1 mostra os limites e prazos para atendimento da CTB e CCS definidos pela IN62 para as regiões Norte/Nordeste, atualizados pela IN7 (BRASIL, 2016).

**Tabela 1** - Requisitos microbiológicos e de contagem de células somáticas do leite cru refrigerado para as regiões Norte/Nordeste de acordo com a Instrução Normativa nº 62 atualizado pela Instrução Normativa nº 7.

Requisitos	Vigência e Limites			
	01/07/2010 a 31/12/2012	01/01/2013 a 30/06/2015	01/07/2015 a 30/06/2017	A partir de 01/07/2019
Contagem de Células Somaticas (células/mL)	750.000	600.000	500.000	400.000
Contagem Total de Bactérias (UFC/mL)	750.000	600.000	300.000	100.000

**Fonte:** Adaptado de: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Atualizado pela Instrução Normativa nº 7, de 3 de maio de 2016.

### 1.3 Qualidade microbiológica do leite cru: Indicadores e situação epidemiológica em Rondônia

A CTB é o indicador que fornece a quantidade de bactérias aeróbicas presentes no leite, sendo utilizada como critério de qualidade sanitária em países que apresentam indústrias lácteas desenvolvidas. Dentre os parâmetros estabelecidos na legislação para a avaliação da qualidade do leite, o atendimento aos limites da CTB se caracteriza por um grande desafio à cadeia produtiva devido às altas contagens e padrão de variação dos resultados, e pelo comprometimento na matéria-prima e seus derivados. A qualidade microbiológica do leite cru resulta, entre outros fatores, das condições de manejo da ordenha e de estocagem, e do armazenamento da matéria-prima (CERQUEIRA, 2006).

A contaminação do leite cru pode ocorrer por micro-organismos presentes no interior da glândula mamária, na superfície exterior do úbere e tetos, na superfície do equipamento de ordenha e do tanque, assim como por utensílios utilizados na ordenha (baldes, latões) e pelas mãos do ordenhador (SANTOS; FONSECA, 2001). Dessa forma, esses fatores determinam a

qualidade microbiológica, e cada etapa nesse processo pode ser responsável pela inclusão de milhões de micro-organismos no leite na ausência de boas práticas de higiene e manutenção (SANTANA et al., 2001). Fatores como a temperatura e tempo de armazenagem do leite são importantes, pois estão diretamente ligados à multiplicação dos micro-organismos, afetando a CTB (FONSECA, 1998).

Considerando a influência da temperatura na conservação do leite cru, a IN51 atualizada pela IN62 estabeleceu a obrigatoriedade do resfriamento do leite na unidade de produção e seu transporte a granel com o objetivo de conservar a sua qualidade até a recepção em estabelecimentos com inspeção sanitária oficial (BRASIL, 2002).

Para o perfil do produtor predominante no estado de Rondônia, caracterizado pela baixa escala de produção, a aquisição de tanques de expansão foi considerada ponto crítico. Resultados obtidos no diagnóstico da cadeia produtiva do leite de Rondônia, em 2002, demonstraram que, os produtores entrevistados dos estratos de produção até 50 litros/dia e de 50 a 100 litros/dia não possuíam tanque de resfriamento, e que o pequeno volume de produção inviabilizava o investimento para sua aquisição (SEBRAE, 2002). Em 2006, dados do Censo Agropecuário demonstrou que 6,8% dos produtores adotavam o uso de tanque de resfriamento no estado, demonstrando o desafio para o atendimento à legislação.

Como alternativa para estas propriedades, foi estimulada a estratégia de utilização de tanques de resfriamento de uso coletivo. Dentro deste contexto, políticas públicas e privadas foram implementadas na região a fim de disponibilizar tanques de expansão a produtores familiares (SOUZA et al., 2009). Em 2013, um levantamento realizado pela Agência de Defesa Agropecuária de Rondônia (IDARON) identificou que 68,5% dos produtores do estado resfriavam o leite em tanques individuais ou coletivos, demonstrando um aumento significativo na adoção desta tecnologia.

Embora tenham sido observados avanços estruturais, com a aquisição de tanques de resfriamento, melhoria das estradas e qualidade da energia elétrica, ainda são observados indicadores insatisfatórios de qualidade microbiológica do leite, em grande parte devido à baixa adoção de boas práticas agropecuárias nos sistemas produtivos do estado e a deficiente logística para o resfriamento do leite (CARVALHO, 2012; DIAS et al., 2013).

De acordo com a IN62, o leite deve estar resfriado a uma temperatura de 4 °C no período máximo de 3 horas após o término da ordenha (BRASIL, 2011). Em Rondônia, a predominância de produtores que adotam o uso de tanques de resfriamento coletivo associado ao clima da região, caracterizado por altas temperaturas e umidade, demonstra que o atendimento às normas estabelecidas se torna essencial para manutenção das características microbiológicas do leite

produzido.

Em estudo realizado por Dias et al. (2015) na microrregião de Ji-Paraná, RO, foi avaliada a qualidade microbiológica do leite total de 266 rebanhos, dos quais observaram que 195 (73,0%) apresentaram CTB > 100.000 UFC/mL, limite final estabelecido pela IN7 para a região Norte/Nordeste. Neste trabalho, a entrega do leite no tanque comunitário realizada por carreteiro foi considerada fator de risco para CTB > 100.000 UFC/mL, demonstrando que esta prática associada a falhas de manejo e alta temperatura da região contribui para a baixa qualidade do leite. Neste trabalho, também foram avaliados 73 tanques de resfriamento e o resultado da distribuição dos resultados de CTB demonstrou mediana de 196.500 UFC/mL e 965.000 UFC/mL para tanques individuais e coletivos respectivamente, demonstrando a importância de conhecer as variáveis associadas à baixa qualidade do leite em tanques de uso comunitário da região. Resultados obtidos por Carvalho (2012), na microrregião de Ji-Paraná/RO, demonstraram médias de CTB estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) no período chuvoso em comparação com período seco, sendo a média geométrica de CTB de 724.000 UFC/mL e 631.000 UFC/mL, respectivamente.

#### **1.4 Microbiota deteriorante do leite cru: Micro-organismos e pontos de contaminação**

Diferentes grupos de micro-organismos podem compor a microbiota deteriorante do leite, destacando os aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes e termodúricos.

##### ***1.4.1 Aeróbios mesófilos***

Os aeróbios mesófilos constituem um grupo de micro-organismos capaz de se multiplicar numa faixa de temperatura entre 20 e 45 °C, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32 °C e, portanto, encontrando nas temperaturas ambientes condições ótimas para o seu metabolismo (FRANCO; LANDGRAF, 1996). São fermentadores de lactose produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos, o que causa a acidez do leite (BRITO et al., 2003). Os micro-organismos mesófilos possuem ampla distribuição no ambiente podendo ser encontrados em animais de sangue quente em ambientes terrestres e aquáticos (MADIGAN et al., 2010).

O resfriamento do leite após a ordenha reduz significativamente a multiplicação dos aeróbios mesófilos, porém, favorece a multiplicação da microbiota psicrotrófica (SANTANA et al., 2001). No entanto, somente a refrigeração não é garantia de qualidade, é importante que o leite cru seja obtido em condições de higiene e sanidade adequados para redução da contaminação inicial (BELLI, 2015).

### ***1.4.2 Psicrotróficos***

Bactérias psicrotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7 °C, sendo os principais agentes de deterioração do leite cru refrigerado e de seus derivados (FRANK et al., 1992). Quando a obtenção e manipulação do leite ocorrem sob condições higiênico-sanitárias adequadas a presença de micro-organismos psicrotróficos se limita a 10% da microbiota total do leite fresco, enquanto que em situações improprias pode representar 75% (NIELSEN, 2002). Esta situação se torna importante, pois alguns micro-organismos psicrotróficos possuem tempo de geração de 20-30 minutos em condições ótimas (GUERREIRO et al., 2005), comprometendo a eficiência da pasteurização que é dependente da carga microbiana inicial presente na matéria-prima (ARCURI et al., 2006).

A ação deterioradora das bactérias psicrotróficas se deve principalmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases, que hidrolisam a proteína e a gordura do leite respectivamente. A maioria das bactérias psicrotróficas não sobrevive à pasteurização, porém, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, podendo resistir ao tratamento Ultra High Temperature (UHT) e permanecerem ativas. A presença de enzimas termoestáveis no leite cru, é especialmente prejudicial para a qualidade do leite UHT devido à sua estocagem à temperatura ambiente por longos períodos de tempo (SØRHOUG; STEPANIAK, 1997). Assim, há uma estreita relação entre a carga microbiana de micro-organismos produtores de enzimas deteriorantes no leite cru e a vida útil dos produtos tratados termicamente.

Segundo Silva et al. (2011), a atividade proteolítica determinada pelas enzimas microbianas está associada à problemas como gelificação do leite UHT e aumento de taxa de sedimentação. Outros efeitos indesejados dessas enzimas incluem alterações de sabor e odor em diversos produtos e redução do rendimento dos queijos (SØRHOUG; STEPANIAK, 1997), levando ao comprometimento da qualidade do queijo, redução da vida de prateleira e consequentes prejuízos financeiros para a indústria.

A lipólise resulta da ação de lipases naturais e, ou, microbianas. Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, caprótico, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. As lipases podem ser responsáveis pela rancificação em queijos (CHEN et al., 2003).

### ***1.4.3 Coliformes***

O grupo dos coliformes totais são, em sua maioria, bactérias pertencentes ao gênero

*Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, que fermentam a lactose produzindo ácido e gás em temperaturas de 35 °C e 37 °C (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A presença de coliformes no leite é indicativa de contaminação ambiental ou de resíduos fecais, indicando falhas de higiene durante a ordenha, no armazenamento ou transporte do leite (SILVEIRA; BERTAGNOLI, 2014). Estes micro-organismos se apresentam em grande quantidade no meio ambiente e caracterizam-se como contaminantes de alimentos crus. Quando identificados em leite tratado termicamente, indica temperatura inadequada de pasteurização ou recontaminação (BELOTI, 2015). O alto nível de contaminação inicial por coliformes no leite pode aumentar rapidamente a taxa de multiplicação desses micro-organismos quando o leite é obtido em condições higiênicas inadequadas (PANTOJA et al., 2011).

Pantoja et al. (2011) estudando os fatores associados às contagens de coliformes em leite cru observou que falhas nos procedimentos de higienização de equipamentos de ordenha e queda das teteiras durante a ordenha foram variáveis associadas ao aumento de coliformes, demonstrando a importância da manipulação e higienização adequada de equipamentos de ordenha.

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é a principal bactéria dentro do grupo dos coliformes. Sua presença nos alimentos demonstra condições higiênicas inadequadas do produto e um forte indicativo da presença de micro-organismos fecais (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Esse micro-organismo é utilizado como indicador de qualidade do leite e de seus derivados, assim como da água utilizada em indústrias.

A ocorrência de *E. coli* em amostras de leite é distinta nas diferentes regiões. Mendes et al. (2016) avaliaram 78 amostras de leite de tanques coletivos do Rio Grande do Sul, observaram 51,28% das amostras positivas para *E. coli*. Estudo realizado por Mattos et al. (2010) avaliaram 53 amostras de leite cru e isolaram *E. coli* em todas as amostras analisadas, indicando contaminação fecal e sugerindo a presença de micro-organismos entéricos patogênicos que causam risco à saúde da população. A legislação brasileira estabelece padrões mínimos para a presença de coliformes fecais no leite pasteurizado de <2,0 NMP/mL (BRASIL, 2011).

#### **1.4.4 Termodúricos**

Micro-organismos termodúricos mesófilos e termodúricos psicrotóxicos, são determinantes da vida útil do leite pasteurizado, pela produção de enzimas deteriorantes e pela resistência à pasteurização, passando a compor a microbiota remanescente no leite pasteurizado. Termodúricos, pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Clostridium* são constantemente

monitorados na fabricação de leite infantil devido à possibilidade de produção de toxinas e a vulnerabilidade de seus consumidores (CONNELL et al., 2016).

Grande parte dos micro-organismos termodúricos são provenientes da formação de esporos, que também podem contaminar o leite (BUEHNER et al., 2014). Os esporos são estruturas de resistência de alguns gêneros de bactérias, que permite sua sobrevivência em meios adversos. Neste formato, as bactérias não causam alterações no leite nem doenças, porém durante a sua esporulação no intestino pode haver produção de toxinas e sintomas de intoxicação (BELOTI, 2015).

No leite os principais gêneros esporulados são os *Bacillus* e os *Paenibacillus*, pois possuem características psicrotróficas e/ou termodúricas capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração e resistirem à pasteurização atravessando toda cadeia do leite (BELOTI, 2015).

Miller et al. (2015) demonstraram alta prevalência de esporos representantes de bactérias mesófilas em tanques de refrigeração em Nova York, associados a diferentes práticas de manejo de ordenha adotados nas fazendas, dentre elas, o manuseio de teteiras e limpeza dos tetos. Estudo realizado por Connell et al. (2016) avaliou esporos de bactérias representantes do gênero *Bacillus* e *Clostridium* em tanques de refrigeração na Irlanda, e demonstrou baixas contagens de esporos no leite cru refrigerado, devido a rigorosa higiene durante a ordenha e lavagem de equipamentos.

#### ***1.4.5 Pontos de contaminação do leite cru***

Estudos avaliando a microbiota deteriorante do leite em tanques comunitários e sistemas de produção de leite em diferentes estados do país demonstram sua importância e a necessidade de intervenção para melhoria da qualidade microbiológica do leite (BRITO et al., 2003; FAGAN et al., 2005; ARCURI et al., 2008; SOUZA et al., 2009; SANTOS et al., 2009; MATSUBARA et al., 2011, SILVA et al., 2011).

Em trabalho realizado por Brito et al. (2003) avaliou-se a qualidade higiênica-sanitária do leite refrigerado em 22 tanques comunitários de sete municípios da Zona da Mata do estado de Minas Gerais por um período de 16 meses. Os resultados das contagens de bactérias psicrotróficas, termodúricas e coliformes indicaram deficiências de higiene da ordenha, especialmente associadas a sujidades de teto, do ambiente dos animais e à má qualidade da água. Souza et al. (2009), pesquisaram micro-organismos deteriorantes em amostras de leite de nove propriedades vinculadas a um tanque comunitário de Sacramento/MG, sendo observados

resultados da contagem de mesófilos entre rebanhos variando de  $6,2 \times 10^2$  UFC/mL a  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL e de micro-organismos psicrotróficos variando de  $3,2 \times 10^2$  UFC/mL a  $9,6 \times 10^5$  UFC/mL. A média geométrica das contagens de mesófilos e psicrotróficos das amostras do tanque realizadas no período de 48 horas foi de  $1,8 \times 10^5$  UFC/mL.

Avaliações realizadas no Rio Grande do Norte, verificaram médias de  $7,0 \times 10^5$  UFC/mL em amostras de leite cru refrigerado (ANDRADE et al., 2014). Em Pernambuco, estudo demonstrou que 83% das amostras de leite cru refrigerado avaliadas apresentavam contagens microbianas superiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL (MATTOS et al., 2010). Embora não se tenha padrões definidos na legislação quanto ao limite máximo de micro-organismos psicrotróficos no leite cru, estudos demonstram que em contagens superiores à  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL ocorre a síntese de lipases e proteases termorresistentes suficientes para promover alterações sensoriais no leite e derivados (MUIR, 1996; COSTA et al., 2002).

Na etapa de obtenção do leite, o procedimento realizado durante a ordenha são determinantes para a qualidade final do produto (SILVA et al., 2011). A qualidade microbiológica inicial do leite cru tem relação direta com a higiene da ordenha e a sanidade do rebanho, e resulta na influência do desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos durante o armazenamento (ALMEIDA et al., 2017).

A avaliação dos pontos de contaminação microbiológica do leite durante a ordenha de propriedades dos estados de Pernambuco e Paraná, apontaram maiores contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas em tetos sujos e teteiras, águas residuais de latão e baldes (FAGAN et al., 2005; MATSUBARA, et al., 2011; SILVA et al., 2011). Estudo realizado por Mattos et al. (2010), demonstrou médias de aeróbios mesofilos de  $1,68 \times 10^7$  UFC/mL e concluiu que grande parte das propriedades avaliadas apresentavam alta contaminação durante a ordenha e que as contagens de bactérias estão acima dos padrões antes mesmo do leite sair da propriedade.

O estudo realizado por Yamazi et al. (2010) identificou os principais pontos de contaminação por aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e *E. coli* em pontos específicos da linha de ordenha, e foi demonstrado que teteiras de ordenhadeiras mecânicas e superfície de tetos dos animais foram pontos importantes de altas contagens de micro-organismos. Nas avaliações realizadas em equipamentos de ordenha, foi demonstrado que as teteiras e a mangueira conectada ao tanque foram os locais de maior contaminação de micro-organismos (WOBETO et al., 2013).



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. M. D.; BRUZAROSKI, S. R.; ZANOL, D.; MELO, M. D.; SANTOS, J. S. D.; ALEGRO, L. C. A.; SANTANA, E. H. W. D. *Pseudomonas* spp. and *P. fluorescens*: population in refrigerated raw milk. **Ciência Rural**, v.47, n.1, p.1-6, 2017.
- ANDRADE, K. D., DO NASCIMENTO RANGEL, A. H., DE ARAÚJO, V. M., DE MEDEIROS, H. R., BEZERRA, K. C., BEZERRIL, R. F., & DE LIMA JÚNIOR, D. M. Qualidade do leite bovino nas diferentes estações do ano no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 213-21, 2014.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGEI, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciências Rural**, v. 38, n.8, p. 2250- 2255. 2008.
- BELLI, Claudinei Zucco Pitro. **Qualidade do leite cru refrigerado obtido em unidades produtoras no sudoeste do Paraná**, 2015. 71p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. PR, 2015.
- BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Planta, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru Refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. Instrução Normativa n. 7 de 3 de maio de 2016. Alteração do caput da Instrução Normativa MAPA n. 62, de 29 de dezembro 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2016.
- BRITO, M.A.V.P.; PORTUGAL, J.A.B.; DINIZ, F.H.; FONSECA, P.C.; ANGELO, F.F.; PORTO, M. A. C. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. In: MARTINS, C.E.; FONSECA, P. C.; BERNARDO, W. F. **Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para a produção de leite em bases sustentáveis**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 21-34, 2003.
- BUEHNER, K. P.; ANAND, S.; GARCIA, A. Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 midwest farms. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.6777-6784, 2014.
- CARVALHO, G. L. O. **Uso da análise espacial para avaliação de indicadores de qualidade do leite na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia**, 2012. 121p. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2012.

- CERQUEIRA, M. M. O. P.; PICININ, L. C. A.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; OLIVEIRA LEITE, M.; PENNA, C. F. D. A. M.; RODRIGUES, R. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. **Perspectivas e avanços na qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Leorges\\_Fonseca/publication/267784170\\_Qualidade\\_da\\_agua\\_e\\_seu\\_impacto\\_na\\_qualidade\\_microbiologica\\_do\\_leite/links/552930a70cf2779ab78f7095.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Leorges_Fonseca/publication/267784170_Qualidade_da_agua_e_seu_impacto_na_qualidade_microbiologica_do_leite/links/552930a70cf2779ab78f7095.pdf)>. Acessado em: 16 ago. 2018.
- CHEN, L. D. R. M.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.
- CONNELL, A.; RUEGG, P. L.; JORDAN, K.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3367-3374, 2016.
- COSTA, M.; GÓMEZ, S.; FRANCISCA, M.; MOLINA, C.; LUZ, H.; SIMPSON, R.; ROMERO, M. Purificación y Caracterización de Proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.2, p.1-13, 2002.
- DIAS, J. A.; ANTES, F., G.; QUEIROZ, R. B.; Fatores de risco associados à ocorrência de resíduos de antibióticos em leite total de rebanhos leiteiros da microrregião de Ji-Paraná do estado de Rondônia. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 13.; WORKSHOP DE POLÍTICAS PÚBLICAS, 13.; SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE DA ATIVIDADE LEITEIRA, 14., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Brasília, DF.; Embrapa, 2015. 1 CD-ROM. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 184).
- DIAS, J. A.; BRITO, L.G.; BARBIERI, F. S. MOREIRA, P.; **O papel das infecções intramamárias na qualidade do leite em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. (Circular Técnica, nº 137)
- FAGAN, E. P.; BELOTI, V.; BARROS, M.F.; MULLER, E. E.; NERO, L.A.; SANTANA, E. H. W.; MAGNANI, D. F.; VACARELLI, E. R.; SILVA, L. C.; PEREIRA, M. S. Evaluation and implementation of good practices in main points of microbiological contamination in milk production. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 83 – 92, 2005.
- FONSECA, L. F. L. Qualidade do leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistema de resfriamento. In: **Simpósio Internacional Sobre Qualidade do Leite**, Curitiba, PR, v.1, p.54-56, 1998.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.
- FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. Standard methods for the examination of dairy products. 16.ed. Washington: **American Public Health Association**, p.271- 286, 1992.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. D. S. M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, n. 1, p.216-222, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal 2016**. Rio de Janeiro, 2016.

IDARON. Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do estado de Rondônia. **Levantamento de dados sobre a produção de leite em Rondônia**. Porto Velho, 2013. 15 p.

IDARON. Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do estado de Rondônia. 2016. Disponível em: <<http://www.idaron.ro.gov.br/portal/Handler.ashx?OP=4&ID=122>>. Acessado em: 28 abr. 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, relatórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite RBQLs, 2011. Disponível em: <[http://cbql.com.br/pdf/4cbql/Eduardo%20Esteves%20%20Relatorio%20dos%20laboratorios%20da%20Rede%20%20Brasileira%20de%20Qualidade%20do%20Leite%20\(RBQL\).pdf](http://cbql.com.br/pdf/4cbql/Eduardo%20Esteves%20%20Relatorio%20dos%20laboratorios%20da%20Rede%20%20Brasileira%20de%20Qualidade%20do%20Leite%20(RBQL).pdf)> Acesso em: 28 abr. 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <[http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?sigsif\\_cons&estabelecimentos](http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?sigsif_cons&estabelecimentos)>. Acessado em: 28 abr. 2018.

MATSUBARA, M. T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO A. A.; BATTAGLINI, A. P. P.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 277-286, 2011.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 173-182, 2010.

MENDES, C. M.; PICOLI, T.; PERES, A. F.; CZERMAINSKI, L. A.; RIPOLL, M. K.; DA SILVA BRAGATO, M.; ZANI, J. L. Caracterização e sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas do leite proveniente de tanques resfriadores de pequenas propriedades do município de Canguçu-RS. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 3, p. 310-322, 2016.

MILLER, R. A.; KENT, D. J.; BOOR, K. J.; MARTIN, N. H.; WIEDMANN, M. Different management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in tank raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4338-4351, 2015.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 1. factors influencing raw and fresh products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.

NIELSEN, S.S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6628-6634, 2002.

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D. J.; RUEGG, P. L. Factors associated with coliform count in unpasteurized bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2680-2691, 2011.

SANTANA, E. D.; BELOTI, V.; BARROS, M. D. A. F., MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.

SANTANA, E. H. W.; FAGNANI, R. **Legislação Brasileira de Leite e Derivados**. Londrina. Unopar, 2014. Disponível em:

<[Http://repositorio.pgsskroton.com.br/bitstream/123456789/7898/1/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Brasileira%20de%20Leite%20e%20Derivados.pdf](http://repositorio.pgsskroton.com.br/bitstream/123456789/7898/1/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Brasileira%20de%20Leite%20e%20Derivados.pdf)>. Acessado em: 21 jul. 2018.

SANTOS, B. L., BARCELLOS, V. C., FUJISAWA, F. M., PEREIRA, J. G., MAZIERO, M. T. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite in natura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 371, p. 35-9, 2009.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotólicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19. 2001.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Diagnóstico do Agronegócio do leite e seus Derivados no estado de Rondônia**. Porto Velho. 2002.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Diagnóstico do Agronegócio do leite e seus Derivados no estado de Rondônia**. Porto Velho, 2015.

SILVA, L. C. C; BELOTI, V.; D'OVÍDIO, R. T. L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes de contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276. 2011.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 2, p. 75-80, 2014.

SØRHOUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SOUZA, A. G.; NORONHA.; C. J.; FIGUEIREDO, F. S.; CRUZ, A. F. Influência da qualidade do leite sobre os custos de uma indústria de laticínios em Goiás. In: Congresso da SOBER, 14., Londrina, 2007. **Anais...**Londrina: SOBER, 2007. Disponível <<http://www.sober.org.br/palestra/6/192.pdf>>. Acessado em: 20 jul. 2018.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CERESER, N.D. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.3, p. 758-761, 2009.

VILELA, D.; RESENDE, J. C. D.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**, v. 26, n. 1, p. 5-24, 2017.

WOBETO, J. R.; POZZA, M. S.; POZZA, P. C.; TSUTSUMI, C. Y.; ECKSTEIN, I. I.; JUNIOR, N. K. Rastreamento de fontes de contaminação do leite cru em diferentes pontos do

processo de produção. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 2, p. 131-139, 2013.

YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Bioscience Journal**, v.26, n. 4, p.610 - 618, 2010.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a microbiota deteriorante do leite cru armazenado em tanques de resfriamento coletivos e em potenciais pontos de contaminação durante a ordenha de sistemas de produção de leite prevalentes em Rondônia

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar os pontos críticos de contaminação microbiológica em sistemas de produção de leite prevalentes em Rondônia;
- Quantificar micro-organismos deteriorantes em pontos de contaminação durante a ordenha em propriedades representativas dos sistemas de produção prevalentes em Rondônia;
- Caracterizar as edificações, manejo e logística de resfriamento do leite de tanques de resfriamento coletivos;
- Quantificar micro-organismos deteriorantes em tanques de resfriamento coletivos.

### 3 PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE PREVALENTES EM RONDÔNIA

#### RESUMO

Considerando a importância da cadeia produtiva do leite em Rondônia, o objetivo do estudo foi quantificar os micro-organismos deteriorantes em pontos da ordenha de quatro sistemas produtivos de leite predominantes no estado. Para isso foram avaliados 17 pontos de contaminação de quatro propriedades leiteiras que representam as características de manejo e instalações predominantes no estado. Foram coletadas amostras do leite (três primeiros jatos e leite total), da água, da superfície e água residual de baldes e latões, teteiras, das mãos do ordenhador e dos tetos. A coleta de amostras foi realizada por meio de suabes estéreis e as áreas amostradas foram delimitadas utilizando-se moldes flexíveis esterilizados. As amostras foram conservadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e então encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Rondônia para análise laboratorial. Para a pesquisa dos micro-organismos, procedeu-se a diluição decimal seriada da amostra em solução salina esterilizada 0,85%. As diluições selecionadas para cada micro-organismo foram semeadas em duplicata, em placas Petrifilm® AC aeróbios mesófilos, Petrifilm® EC coliformes totais/ *Escherichia coli* conforme recomendação do fabricante. Para a contagem de psicrotróficos e termofílicos psicrotróficos, as amostras foram semeadas em duplicata pelo método de semeadura em superfície, em ágar padrão leite a 10%. As propriedades avaliadas eram caracterizadas por baixa adoção de boas práticas e infraestrutura deficiente. Das propriedades avaliadas, três adotavam a ordenha manual e uma ordenha mecânica balde ao pé. A média da contagem de aeróbios mesófilos e coliformes totais em baldes/latões foram de  $2,4 \times 10^8$  e  $1,3 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente. Nos tetos, a média das contagens de aeróbios mesófilos foi de  $2,7 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e de coliformes totais  $8,2 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>. O resultado da contagem de bactérias demonstrou que utensílios (baldes/latões) e tetos dos animais foram os principais pontos críticos de contaminação de micro-organismos mesófilos e coliformes, corroborando com estudos realizados em diferentes estados brasileiros. Os resultados mostram a importância da adoção de boas práticas de ordenha, e que a lavagem adequada de baldes e latões e a desinfecção dos tetos antes da ordenha devem ser priorizadas a fim de reduzir/eliminar a contaminação microbiológica e melhorar a qualidade e segurança da matéria-prima.

**Palavras-chave:** Micro-organismos deteriorantes. Pontos de contaminação. Qualidade do leite

## ABSTRACT

Considering the importance of the production of milk in Rondônia, the objective of this study was quantify the microorganisms in points of the milking of four systems of milk predominant in state. For this, 17 points of contamination of four dairy farms were evaluated, which represent the management characteristics and the predominant facilities in the state. The samples of milk (first three jets and total milk), water, surface and residual water were collected from buckets and brass, ceiling, from the hands of the milker and the ceilings. Sample collection was performed using sterile swabs and the areas sampled were delimited using sterilized flexible molds. The samples were stored in isothermal boxes containing recyclable ice and then sent to the Laboratory of Milk quality of the Embrapa Rondônia for laboratory analysis. For the detection of the microorganisms, the serial decimal dilution of the sample was carried out in sterile 0.85% saline solution. The selected dilutions for each microorganism were seeded in duplicate in Petrifilm® AC aerobic mesophilic plates, Petrifilm® EC coliform total and *Escherichia coli* according to the manufacturer's recommendation. For the counting of psychrotrophic and psychrotrophic thermotolerants, the samples were seeded in duplicate by the surface sowing method, in standard 10% milk agar. For the study of thermotolerant microorganisms mesophilic and psychrotrophic, the samples were submitted to thermal treatment ( $62.8 \pm 0.5$  °C) and cooled to 10 °C. The properties evaluated were characterized by low application of good practices and precarious infrastructure. Of the evaluated properties, three adopted manual milking and mechanical milking bucket on foot. The average count of mesophilic aerobic and total coliform in buckets / brass were  $2.4 \times 10^8$  CFU/cm<sup>2</sup> and  $1.3 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup> respectively. In the ceilings, the average counts of mesophilic aerobes were  $2.7 \times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> and total coliforms were  $8.2 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup>. The results of bacterial counts showed that utensils (buckets/brasses) and ceilings of the animals were the main contamination points of mesophilic and coliform microorganisms, corroborating with studies carried out in different Brazilian states. The results show the importance of adopting good milking practices and that proper washing of buckets and brasses and disinfection of ceilings prior to milking should be prioritized in order to reduce / eliminate microbiological contamination and improve the quality and safety of the feedstock.

**Key words:** Points of microbiological contamination. Microorganisms. Milk quality.



### 3.1 Introdução

A cadeia produtiva do leite em Rondônia tem se fortalecido nos últimos anos, colocando o agronegócio do leite em posição de destaque na economia do estado. Rondônia é o nono maior produtor de leite no Brasil com uma produção em 2016 de 790.947 milhões de litros, correspondendo a 42,1% da produção da região Norte (IBGE, 2016). A agricultura familiar representa cerca de 70% da produção de leite em Rondônia e deste grupo se destacam assentados de reforma agrária e comunidades, o qual remete a importância socioeconômica da atividade no estado (IBGE, 2006).

Dentro dos aspectos que envolvem a cadeia produtiva do leite, a qualidade é um ponto de extrema importância devido a fatores como, a garantia de alimento seguro e com qualidade nutricional para o consumidor, aumento da vida de prateleira e rendimento industrial de derivados lácteos. Dentre os parâmetros estabelecidos na legislação para a avaliação da qualidade do leite, o atendimento aos limites para a Contagem Total Bacteriana (CTB) se caracteriza por um grande desafio à cadeia produtiva devido às altas contagens e padrão de variação dos resultados e pelo comprometimento na matéria prima e seus derivados.

A qualidade microbiológica do leite cru resulta entre outros fatores, das condições de manejo da ordenha e de estocagem e armazenamento da matéria-prima (CERQUEIRA et al., 2006). A contaminação do leite pode ocorrer por micro-organismos presentes no interior da glândula mamária, na superfície exterior do úbere e tetos, na superfície do equipamento de ordenha e do tanque, assim como por utensílios utilizados na ordenha (baldes, latões) e pelas mãos do ordenhador (SANTOS; FONSECA, 2001).

Estudos realizados em Rondônia demonstram os desafios a serem enfrentados para adequação aos padrões de qualidade do leite definidos na legislação (CARVALHO, 2012; DIAS et al., 2013; DIAS et al., 2015). Em estudo realizado por Dias et al. (2015) na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia, foi avaliada a qualidade microbiológica do leite total de 266 rebanhos, e observaram que 195 (73,0%) apresentaram CTB > 100.000 UFC/mL, limite máximo da contagem estabelecido pela IN7 para a região Norte/Nordeste. Neste trabalho, a entrega do leite no tanque comunitário realizada por carreteiro foi considerada fator de risco para CTB > 100.000 UFC/mL, demonstrando que esta prática associada a falhas de manejo da ordenha e alta temperatura da região contribui para a baixa qualidade do leite.

Diferentes grupos de micro-organismos podem compor a microbiota deteriorante do leite. Os aeróbios mesófilos incluem um grupo de micro-organismos capazes de se multiplicarem numa faixa de temperatura entre 20 e 45 °C, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32 °C e, portanto, encontrando nas temperaturas ambientes condições ótimas para

o seu metabolismo (FRANCO; LANDGRAF, 1996). São fermentadores de lactose produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos, o que causa a acidez do leite (BRITO et al., 2003). O resfriamento do leite após a ordenha reduz significativamente a multiplicação dos aeróbios mesófilos, porém, favorece a multiplicação da microbiota psicotrófica (SANTANA et al., 2001). Bactérias psicotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7 °C, sendo os principais agentes de deterioração do leite cru refrigerado e de seus derivados (FRANK et al., 1992).

Os coliformes são bactérias capazes de fermentar a lactose produzindo gás quando incubadas a temperaturas de 35 – 37 °C, e são pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. Esse grupo inclui espécies de bactérias como a *Escherichia coli* originadas no trato-gastrointestinal de humanos e outros animais e sua presença nos alimentos indica contaminação de origem fecal (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Considerando a importância socioeconômica da cadeia produtiva do leite para o estado, a baixa qualidade microbiológica da matéria-prima evidenciada nos estudos previamente realizados, e a grande diversidade de micro-organismos deteriorantes do leite, que contribuem para a baixa qualidade nutricional e organoléptica, o baixo rendimento e vida útil do leite e derivados, este trabalho teve o objetivo de avaliar os pontos de contaminação da microbiota deteriorante do leite em sistemas de produção de leite predominantes em Rondônia.

## **3.2 Material e Métodos**

### ***3.2.1 Local e população do estudo***

O estudo foi realizado em quatro propriedades leiteiras localizadas no estado de Rondônia, que representam as características de manejo e instalações predominantes no estado. As propriedades foram classificadas em três níveis de acordo com o grau de adoção de tecnologias. Para a definição do perfil das propriedades a serem avaliadas foram consideradas as informações obtidas de questionários epidemiológicos aplicados a produtores de leite das principais microrregiões produtoras de leite do estado: Ji-Paraná, Cacoal e Ariquemes (DIAS et al., 2013; DIAS et al., 2015; DIAS et al., 2017a).

Considerando o clima predominante em Rondônia (Tipo Aw - Clima Tropical Chuvoso), as avaliações foram realizadas no período chuvoso, nos meses de outubro a dezembro de 2017.

### ***3.2.2 Identificação dos pontos críticos de contaminação microbiológica do leite cru***

### 3.2.2.1 Coleta de amostras e dados

Em cada propriedade selecionada, os pontos de contaminação foram identificados de acordo com o sistema de ordenha e práticas de higiene adotadas. Foram coletadas amostras do leite (três primeiros jatos e leite total), da água (pontos de utilização), dos utensílios de ordenha (baldes, latões e coador), do equipamento de ordenha (teteiras), da água residual dos equipamentos e utensílios, das mãos do ordenhador e dos tetos.

Nos latões, baldes e coador a área amostrada foi de 100 cm<sup>2</sup>, tetos e teteiras 3 cm<sup>2</sup> e mãos do ordenhador de 5 cm<sup>2</sup>. As áreas amostradas foram delimitadas utilizando-se moldes flexíveis de polietileno esterilizados conforme metodologia de Santana et al. (2001). Para o transporte das amostras, foi utilizado caldo Lethen a fim de neutralizar a ação de resíduos de sanitizantes. Para coleta das amostras de leite e água, foram utilizados frascos de vidro estéreis com tampa de rosca. As amostras de leite total foram coletadas seguindo os procedimentos descritos por Dias e Antes (2012). As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite localizado na Embrapa Rondônia para realização das análises laboratoriais.

### 3.2.2.2 Análise microbiológica

Para a enumeração de micro-organismos deteriorantes, as amostras dos pontos de contaminação foram diluídas serialmente em escala decimal utilizando solução salina esterilizada 0,85% (até 10<sup>-5</sup>).

Para a contagem de aeróbios mesófilos e coliformes/*Escherichia coli* (*E. coli*), as diluições selecionadas foram semeadas em duplicata em placas Petrifilm<sup>®</sup> AC e Petrifilm<sup>®</sup> EC, respectivamente (3M Company, St. Paul, MN, EUA), seguindo os procedimentos descritos por Morton (2001) e interpretadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a contagem de psicrotróficos e termodúricos psicrotróficos foi utilizado o método de semeadura em superfície, em duplicata, em ágar padrão para contagem (PCA) acrescido de leite em pó à 10%, e incubados a 7 °C por 10 dias conforme procedimento descrito por Frank e Yousef (2004). Para a determinação da contagem de termodúricos, foi realizado o preparo térmico da amostra antes de proceder a diluição das amostras de leite. Para isso, uma alíquota de 5 mL da amostra de leite foi incubada em banho-maria a 62,8 °C por 30 minutos. Para a contagem de termodúrico mesófilo, foi utilizado o método em superfície em PCA e incubadas a 37 °C por 48-72 horas de acordo com Frank e Yousef (2004).

### 3.2.3 Avaliação da sanidade da glândula mamária

#### 3.2.3.1 Coleta de amostras e dados

A avaliação da sanidade da glândula mamária foi realizada em 63 vacas em lactação durante a ordenha dos animais nas quatro propriedades avaliadas. O diagnóstico da mastite clínica foi realizado considerando as alterações macroscópicas do leite (presença de pus, grumos e/ou estrias de sangue) na prova da caneca telada de fundo escuro, e na presença de sinais de inflamação na glândula mamária. A mastite subclínica foi avaliada utilizando o *California Mastitis Test* (CMT) (SCHALM et al., 1971) e a determinação da contagem de células somáticas eletrônica (CCS).

Para o diagnóstico microbiológico da mastite, foi obtida amostra de leite, procedendo à desinfecção dos tetos, secagem com papel toalha e antissepsia com álcool 70°GL. Foi coletado cerca de 4 mL de leite em tubos de vidro com tampa de rosca estéreis, com o cuidado de retirar quantidade igual de leite de cada quarto mamário (NMC, 2004).

Para a determinação da CCS foi realizada coleta de amostra representativa da produção total de cada animal na primeira e única ordenha do dia, em frascos contendo o conservante bronopol conforme descrito por Dias e Antes (2012).

As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite localizado na Embrapa Rondônia para realização das análises laboratoriais.

#### 3.2.3.2 Diagnóstico microbiológico e indicadores

Para o diagnóstico microbiológico da mastite, semeou-se um volume de 10 µL de cada amostra de leite em placa de ágar-sangue (5% de sangue desfibrinado de carneiro). As placas foram incubadas a 37 °C em aerofilia por até 120 horas, procedendo às leituras às 24, 48 e 120 horas após a incubação. As colônias isoladas em ágar sangue foram observadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação, presença de hemólise. Os micro-organismos isolados foram observados ao microscópio por meio de esfregaços corados pelo método de Gram. A significância do número de colônias dos micro-organismos isolados foi interpretada segundo os critérios propostos pelo *National Mastitis Council* (NMC, 1987). Bactérias do gênero *Streptococcus* foram identificadas pela ausência de produção de catalase, teste de CAMP e hidrólise da esculina. O gênero *Staphylococcus* foi classificado de acordo com o resultado das provas de produção de catalase, coagulase e acetoina. Amostras consideradas contaminadas

foram aquelas em que houve crescimento de três ou mais colônias diferentes no isolamento primário, sem o predomínio de nenhuma delas (NMC, 2004).

A determinação de CCS foi realizada por citometria de fluxo no equipamento Combiscope FTIR 400 (Delta Instruments).

#### **3.2.4 Análise dos dados**

Para determinar a contagem dos grupos de micro-organismos avaliados foi considerada a média da contagem da diluição selecionada de cada ponto de contaminação considerando os critérios definidos por Silva et al. (2010). A contagem dos micro-organismos foi expressa em UFC/mL ou UFC/cm<sup>2</sup> conforme o ponto de contaminação avaliado. Nos pontos de contaminação em que a coleta foi realizada utilizando moldes flexíveis e suabes, o cálculo da contagem dos micro-organismos foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Silva et al. (2010):

$$\text{UFC/cm}^2 = \text{UFC/mL da suspensão} * \frac{\text{área amostrada}}{\text{volume do diluente}}$$

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### **3.3.1 Caracterização das propriedades**

Foram avaliadas quatro propriedades leiteiras representativas das características de manejo e instalações predominantes no estado de Rondônia.

Estudos realizados no estado evidenciaram baixo padrão tecnológico nos sistemas de produção de leite no estado, definidos por: sistemas de produção a pasto, com baixa adoção de tecnologias para seu manejo, baixa escala de produção de leite por rebanho concentrada na faixa até 50 litros/dia; animais pouco especializados para a produção de leite; sistema de ordenha manual e realizada uma vez por dia; e baixa adoção de boas práticas de ordenha e controle da mastite (CARVALHO, 2012; SEBRAE, 2013; DIAS et al., 2013; DIAS et al., 2014; SEBRAE, 2015; DIAS et al., 2015; DIAS et al., 2017a).

As propriedades avaliadas no presente estudo eram caracterizadas por produção de leite variando de 45 a 90 litros/dia e número de vacas em lactação variando de 11 a 23 animais. Das propriedades estudadas, três adotavam a ordenha manual, sendo realizada em estrutura de chão batido e/ou piquete, com e sem cobertura. Uma propriedade adotava a ordenha mecânica balde

ao pé, sendo realizada em curral, com piso de cimento e cobertura. Em todas as propriedades, era realizada apenas uma ordenha diária pelo produtor e/ou familiares, com a presença do bezerro durante a ordenha. Quanto ao manejo da ordenha, foi observada baixa adoção das práticas recomendadas para a higiene e para prevenção e controle da mastite Tabela 2.

A lavagem de utensílios e equipamentos de ordenha era realizada pelo produtor ou familiares. A fonte de água utilizada para limpeza era o poço com profundidade variando de 8 a 10 metros, sendo tratadas com cloro em três das propriedades avaliadas. Foram observadas vestimentas não adequadas dos ordenhadores e falhas nos procedimentos de lavagem de latões, baldes e coador. Os utensílios eram armazenados após a limpeza predominantemente em área externa da propriedade e sem cobertura.

Todas as propriedades avaliadas forneciam leite para estabelecimentos com serviço de inspeção oficial e entregavam leite em tanques de resfriamento coletivos. A captação do leite pela indústria era realizada a cada 36 horas. As características de manejo e instalações das propriedades avaliadas estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características de manejo e instalações das propriedades avaliadas, Rondônia, 2017.

Características da propriedade	Propriedades avaliadas			
	P1	P2	P3	P4
Vacas em lactação	20	19	11	23
Produção média de leite (litros/dia)	80	90	45	90
Identificação dos animais	Não	Sim	Não	Sim
Cobertura curral	Não	Sim	Parcial	Sim
Piso curral	Chão batido	Chão batido	Chão batido	Cimento
Ponto de água no curral	Não	Sim	Não	Sim
Fonte de água	Poço	Poço	Poço	Poço
Tratamento de água	Cloro	Não	Cloro	Cloro
Tipo de ordenha	Manual	Manual	Manual	Mecânica
Nº de ordenhas diárias	1	1	1	1
Presença de bezerro	Sim	Sim	Sim	Sim
Examina primeiros jatos de leite	Não	Não	Não	Não
Lavagem dos tetos	Não	Sim	Não	Sim
Desinfecção dos tetos antes da ordenha	Não	Sim	Não	Não
Secagem dos tetos	Não	Sim <sup>a</sup>	Não	Sim <sup>b</sup>
Desinfecção dos tetos depois da ordenha	Não	Não	Não	Não
Lavagem das mãos	Não	Sim	Não	Sim
Resfriamento e conservação do leite	TC <sup>c</sup>	TC	TC	TC
Periodicidade de captação do leite (horas)	36	36	36	36
Responsável pela limpeza de baldes/latões	Produtor	Produtor	Produtor	Produtor
Local de armazenamento de baldes/latões	Edificação do tanque	Externo sem cobertura	Externo sem cobertura	Curral

<sup>a</sup> Secagem dos tetos com pano; <sup>b</sup> Secagem dos tetos com papel toalha; <sup>c</sup> TC Tanque coletivo

### 3.3.2 Avaliação dos pontos de contaminação do leite cru

Foram avaliados 17 pontos de contaminação em propriedades que adotavam ordenha manual e 22 pontos de contaminação na propriedade que utilizava ordenha mecânica. Os pontos avaliados foram: amostras de leite (três primeiros jatos e leite total), água de uso (no ponto de utilização), parede, fundo e água residual dos utensílios (baldes, latões e coador), dos equipamentos (conjunto de teteiras), mãos do ordenhador e parede dos tetos. O resultado das contagens médias de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), psicrotróficos (P), psicrotróficos proteolíticos (PP), termodúricos mesófilos (TM) e termodúricos psicrotróficos (TP) em amostras de leite total e dos três primeiros jatos estão apresentados na Tabela 3.

As amostras de leite total das propriedades avaliadas foram coletadas nos latões antes do transvase no tanque coletivo. A variação das contagens médias dos principais micro-organismos avaliados em leite total foi de  $3,4 \times 10^4$  UFC/mL (P2) a  $3,7 \times 10^5$  UFC/mL (P3) para aeróbios mesófilos, de  $< 10$  UFC/mL (P2) a  $1,4 \times 10^5$  UFC/mL (P1) para psicrotróficos e de  $< 100$  UFC/mL (P2) e  $1,4 \times 10^4$  UFC/mL (P1) para coliformes totais.

Os três primeiros jatos de leite (volume aproximado de 100 a 150 mL de leite)

apresentaram contagens para os diferentes micro-organismos avaliados, sendo observado contagens de aeróbios mesófilos em todas as propriedades estudadas. A presença do bezerro era prática adotada nas propriedades, entretanto observou-se que em algumas propriedades selecionava-se um quarto mamário para o bezerro mamar, permitindo que os três primeiros jatos dos outros quartos mamários fossem incorporados ao leite total, contribuindo para a contaminação final do leite. A média da contagem de AM dos primeiros jatos foi  $2,7 \times 10^3$  UFC/mL. Estudo realizado por Silva et al. (2011) considerou os primeiros jatos pontos importantes de contaminação, com contagens de micro-organismos mesófilos de  $5,6 \times 10^4$  UFC/mL.

O resultado das contagens médias dos micro-organismos deteriorantes de água de uso, tetos e mão do ordenhador nas propriedades avaliadas estão apresentados na Tabela 4.

A qualidade da água utilizada na atividade leiteira é fundamental para garantir a limpeza e desinfecção das instalações/equipamentos e assegurar a saúde humana e animal, fundamental para a produção de leite seguro (CERQUEIRA et al., 2006). A média da contagem de CT nas amostras da água utilizada nas propriedades foi de  $1,6 \times 10^2$  UFC/mL, sendo observadas contagens na P1 e P4. Em uma propriedade (P3) não foram isolados micro-organismos deteriorantes na água utilizada para a lavagem dos utensílios e mãos.

Tetos não higienizados são considerados importantes pontos de contaminação do leite por bactérias mesófilas (SANTANA et al., 2001; SILVA et al., 2011). No presente trabalho, os tetos dos animais apresentaram contagens médias de AM, P e CT de  $9,1 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>,  $8,1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $1,1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente, demonstrando a importância dos tetos como fonte de contaminação por bactérias deteriorantes durante a ordenha. As avaliações dos pontos de contaminação foram realizadas durante o período chuvoso, predominante em Rondônia. As áreas de permanência dos animais entre as ordenhas e curral de espera apresentavam lama predispondo ao aumento das sujidades dos tetos e úbere dos animais, podendo se apresentar como um ponto importante de contaminação do leite e fator de risco para a mastite ambiental. Estudo realizado por Fagundes et al. (2006), demonstraram que a quantidade de lama e fezes observadas no curral podem ter contribuído para a elevada contagem de *Pseudomonas spp* nas amostras de leite avaliadas. No período entre as ordenhas, os animais podem entrar em contato com lama, fezes e material de cama, e a aderência destes materiais em tetos e úbere, quando não eliminados antes da ordenha pode contribuir com intensa contaminação do leite (OLIVEIRA; BRANDESPIM, 2009).

As mãos dos ordenhadores se constituíram importante fonte de contaminação do leite por micro-organismos AM e P (Tabela 4). Em duas propriedades (P1 e P4), houve redução das



contagens médias de AM após a ordenha. Na P1, o produtor não lavava as mãos durante a ordenha, indicando que esta contaminação pode ter sido incorporada aos tetos e ao leite. Mesmo em situações em que não há manipulação direta do leite (ordenha mecânica), o ordenhador constitui principal ligação entre equipamentos, utensílios, animais e o leite, podendo contribuir para a transferência de micro-organismos durante a ordenha (TAVARES et al., 2017).

A contagem média dos micro-organismos deteriorantes nas teteiras, baldes, latões e coador estão apresentados na Tabela 4. Os utensílios de ordenha, como latões e baldes apresentaram altas contagens de micro-organismos, indicando falhas nos procedimentos de higienização e armazenamento. Nas propriedades avaliadas, os utensílios após lavados eram armazenados em área externa sem cobertura e assim expostos a poeira e chuva. Na P1 e P4 foi observado água residual nos baldes e latões e altas contagens de AM, P e CT. As contagens médias de AM na água residual de baldes/latões variaram de  $2,2 \times 10^7$  a  $1,4 \times 10^8$  UFC/mL e de P variaram de  $6,7 \times 10^4$  a  $4,3 \times 10^6$  UFC/mL, demonstrando que a higienização adequada dos utensílios e forma de armazenamento são pontos críticos que devem priorizados para redução da contaminação. Os psicrotóxicos, possuem alto poder deterioração do leite em condições de refrigeração. Estudos realizados por Baur et al. (2015) confirmaram alta prevalência de micro-organismos Gram negativos produtores de enzimas em amostras de leite cru refrigerado, sendo 80% do gênero *Pseudomonas*. Grande parte dos micro-organismos psicrotóxicos não resistem ao processo de pasteurização, porém muitos produzem enzimas hidrolíticas que são termo resistentes, permanecendo ativas mesmo após o tratamento UHT (CHEN et al., 2003).

O sistema de ordenha mecânica era adotado apenas na propriedade P4. As teteiras apresentaram maiores contagens dos micro-organismos AM, P e CT respectivamente, sendo a contagem média de AM de  $1,5 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> no início da ordenha e de  $2,0 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> ao fim da ordenha dos animais. O produtor não adotava as recomendações para lavagem e manutenção do equipamento de ordenha, sendo observadas falhas nos procedimentos de lavagem e desgaste nas teteiras e mangueiras, tornando um elemento adicional de contaminação microbiológica do leite. De acordo com Santana et al. (2001), altas contagens de micro-organismos nos copos de teteiras, indicam falhas na higienização do equipamento, como uso incorreto de concentrações de sanitizantes, temperaturas inadequadas e atraso na troca de borrachas/teteiras. Falhas ou ausência de manutenção do equipamento de ordenha pode resultar em rachaduras e fissuras nas teteiras/mangueiras devido ao desgaste de uso e predispor ao acúmulo de leite e à multiplicação de bactérias levando a um aumento na contagem de bactérias (GUERREIRO et al., 2005).

**Tabela 3** - Contagens médias de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), psicotróficos (P), psicotróficos proteolíticos (PP), termodúricos mesófilos (TM) e temodúricos psicotróficos (TP) em amostras dos primeiros jatos de leite e leite total de quatro propriedades, Rondônia, 2017.

Amostras de leite	P1					P2					P3					P4										
	AM	CT	EC	P	PP	AM	CT	EC	P	PP	TM	TP	AM	CT	EC	P	PP	TM	TP	AM	CT	EC	P	PP	TM	TP
Três primeiros jatos <sup>a</sup>	2,7x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>2</sup>	2,7x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	< 100	7,5x10 <sup>3</sup>	< 10	< 10	1,0x10 <sup>1</sup>	< 10	1,2x10 <sup>1</sup>	0,2x10 <sup>1</sup>	5,2x10 <sup>2</sup>	< 10	< 10	< 1/mL	< 1/mL	1,0x10 <sup>1</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	5,2x10 <sup>1</sup>	0,1x10 <sup>1</sup>	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL	0,5x10 <sup>1</sup>	0,5x10 <sup>1</sup>
Leite total <sup>a</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	< 100	1,4x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>4</sup>	< 100	< 100	< 10	< 10	1,0x10 <sup>2</sup>	< 1/mL	3,7x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	< 100	6,5x10 <sup>2</sup>	< 10	1,0x10 <sup>2</sup>	< 1/mL	3,6x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>1</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	< 1/mL	9,3x10 <sup>1</sup>	< 1/mL

<sup>a</sup> Contagens expressas UFC/mL

**Tabela 4** - Contagens médias de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), psicotróficos (P) e psicotróficos proteolíticos (PP) em água de uso, tetos, mãos do ordenhador, equipamentos e utensílios de ordenha, de quatro propriedades, Rondônia, 2017.

Pontos de Contaminação	P1					P2					P3					P4				
	AM	CT	EC	P	PP	AM	CT	EC	P	PP	AM	CT	EC	P	PP	AM	CT	EC	P	PP
<i>Água de uso, tetos e mãos do ordenhador</i>																				
Água de uso <sup>a</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	3,0x10 <sup>1</sup>	< 100	0,5x10 <sup>1</sup>	< 10	9,8x10 <sup>1</sup>	< 1/mL	< 10	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL	2,3x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>1</sup>	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL
Parede do teto <sup>b</sup>	5,6x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>1</sup>	< 100	1,8x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>	0,5x10 <sup>1</sup>	0,4x10 <sup>1</sup>	4,3x10 <sup>2</sup>	< 10	8,1x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>1</sup>	0,9x10 <sup>1</sup>	6,6x10 <sup>2</sup>	0,9x10 <sup>1</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>2</sup>	0,1x10 <sup>1</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	0,2x10 <sup>1</sup>
Mão do ordenhador antes da ordenha <sup>b</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	< 100	< 100	< 100	< 100	8,3x10 <sup>2</sup>	< 10	< 10	1,3x10 <sup>1</sup>	< 1/mL	3,3x10 <sup>3</sup>	< 10	< 10	2,6x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	< 1/mL	< 1/mL	1,4x10 <sup>2</sup>	< 1/mL
Mão do ordenhador depois da ordenha <sup>b</sup>	5,6x10 <sup>3</sup>	< 100	< 100	< 100	< 100	3,5x10 <sup>4</sup>	< 10	< 10	3,6x10 <sup>2</sup>	0,6x10 <sup>1</sup>	5,2x10 <sup>4</sup>	< 10	< 10	4,0x10 <sup>2</sup>	0,6x10 <sup>1</sup>	8,5x10 <sup>4</sup>	< 1/mL	< 1/mL	2,5x10 <sup>1</sup>	< 1/mL
<i>Utensílios e equipamentos de ordenha</i>																				
Teteira antes da ordenha <sup>b</sup>	NU <sup>c</sup>	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	1,5x10 <sup>5</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	0,7x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	0,9x10 <sup>1</sup>
Teteira depois da ordenha <sup>b</sup>	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	2,0x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	0,4x10 <sup>1</sup>	7,7x10 <sup>3</sup>	0,5x10 <sup>1</sup>
Água residual do balde <sup>a</sup>	3,5x10 <sup>7</sup>	7,6x10 <sup>6</sup>	< 100	1,2x10 <sup>5</sup>	< 10	NO <sup>d</sup>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	5,2x10 <sup>7</sup>	4,3x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>2</sup>
Parede de balde <sup>b</sup>	2,9x10 <sup>7</sup>	3,6x10 <sup>6</sup>	< 100	2,0x10 <sup>6</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>5</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>	< 10	1,6x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	6,1x10 <sup>6</sup>	2,2x10 <sup>3</sup>	< 100	6,2x10 <sup>3</sup>	< 10	1,4x10 <sup>7</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	1,9x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>
Água residual do latão <sup>a</sup>	2,2x10 <sup>7</sup>	3,5x10 <sup>6</sup>	< 100	4,3x10 <sup>6</sup>	3,6x10 <sup>6</sup>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	1,4x10 <sup>8</sup>	6,3x10 <sup>3</sup>	< 10	> 6,5x10 <sup>6</sup>	< 1/mL
Parede de latão <sup>b</sup>	5,0x10 <sup>8</sup>	9,7x10 <sup>7</sup>	< 100	2,1x10 <sup>7</sup>	2,1x10 <sup>7</sup>	6,1x10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	4,4x10 <sup>6</sup>	< 10	1,2x10 <sup>9</sup>	8,2x10 <sup>6</sup>	< 100	2,5x10 <sup>3</sup>	< 10	1,9x10 <sup>8</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>	< 10	2,8x10 <sup>3</sup>	< 1/mL
Coador <sup>b</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	< 100	< 100	< 100	< 100	2,8x10 <sup>4</sup>	< 10	< 10	< 1/mL	< 1/mL	2,1x10 <sup>4</sup>	< 10	< 10	1,2x10 <sup>2</sup>	< 10	1,5x10 <sup>5</sup>	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL	< 1/mL

<sup>a</sup> Contagens expressas UFC/mL; <sup>b</sup> Contagens expressas UFC/cm<sup>2</sup>; <sup>c</sup> Não utilizado; <sup>d</sup> Não observado

### 3.3.3 Avaliação da sanidade da glândula mamária

O diagnóstico microbiológico das amostras de leite das vacas em lactação nas propriedades avaliadas demonstrou frequência de animais com isolamentos de patógenos da mastite que variaram de 50% (P2) a 100% (P4) (Tabela 5). Os micro-organismos mais frequentemente isolados foram *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) (27,91%) e *Corynebacterium bovis* (CB) (20,93%).

Vacas que não apresentaram crescimento bacteriano apresentaram menor número de células somáticas do que as vacas com isolamento do patógeno ( $P < 0,05$ ), sendo 94.000 células/mL e 406.000 células/mL respectivamente. Entre os patógenos isolados, a associação *Staphylococcus aureus* + SCN foi responsável pela maior elevação de CCS, com contagem de 919.000 células/mL, seguida pelos *Staphylococcus aureus* com média de 487.000 células/mL e SCN com média de 474.000 células/mL. Patógenos menores como o *Corynebacterium bovis* demonstraram média de 183.000 células/mL. A contagem de células somáticas do leite total das propriedades avaliadas variou de 110.000 células/mL (P4) e 301.000 células/mL (P1).

Dentre os patógenos causadores de infecção intramamária bovina, o gênero *Staphylococcus* é o mais prevalente, sendo mais frequentes os isolados de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus* coagulase positivo não-*aureus* (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN). Estudos realizados em Rondônia demonstram a predominância do gênero *Staphylococcus* como agente causador da mastite subclínica em rebanhos de diferentes regiões do estado (DIAS et al., 2013; DIAS et al., 2017b).

Embora a presença de mastite não seja uma das causas principais de altas contagens de micro-organismos no leite cru, a sua ocorrência pode contribuir para o aumento da contagem de bactérias. A influência dos patógenos da mastite na contagem de bactérias depende da porcentagem de quartos mamários infectados e do tipo de patógeno isolado. O estágio da infecção intramamária também pode contribuir com um aumento da liberação de bactérias da glândula mamária (SEARS et al., 1990; KEEFE, 1997).

Estudos realizados em diferentes países demonstraram que patógenos do gênero *Streptococcus* spp. foram responsáveis por repentinos aumentos na CTB do leite de rebanhos e *S. aureus* foi associado à pequena elevação na contagem bacteriana (GONZALEZ et al., 1986; HAYES et al., 2001; ZADOKS et al., 2004; RYSANEK; BABAK, 2005).

Lopes Junior (2010) demonstrou as médias geométricas de CTB (UFC/mL) e CCS (céls/mL) de acordo com patógenos isolados de mastite, e observaram que *Streptococcus agalactiae* apresentaram as maiores contagens de bactérias seguido por *Streptococcus* spp. que

não o *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* e SCN. Os resultados demonstraram que quanto maior a intensidade do processo inflamatório, maior liberação de bactérias pela glândula mamária, sendo a CCS uma ferramenta útil no controle da mastite e também na manutenção de baixas CTB.

No presente estudo, bactérias do gênero *Streptococcus* foram isoladas de animais da propriedade P4, entretanto não foram isolados *Streptococcus agalactiae*. Dos nove animais avaliados, cinco apresentaram isolamento de bactérias do gênero *Streptococcus*, e a contagem de células somáticas de amostras de leite total da propriedade foi de 110.000 céls/mL, demonstrando pouco impacto da infecção na CCS do rebanho.

**Tabela 5** - Patógenos da mastite isolados em amostras de leite de vacas em lactação nas quatro propriedades avaliadas, Rondônia, 2017.

Infecção Intramamária	P1	P2	P3	P4	Total	n (MACCS) <sup>1</sup>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Sem crescimento bacteriano	3 (33,3)	7 (50,0)	3 (27,2)	0 (0,0)	13 (30,23)	13 (94.000)
SCN <sup>2</sup>	2 (22,3)	7 (50,0)	1 (9,0)	2 (22,2)	12 (27,91)	10 (474.000)
CB <sup>3</sup>	3 (33,3)	0 (0,0)	4 (36,3)	2 (22,2)	9 (20,93)	7 (183.000)
STEN <sup>4</sup> + SCN	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (22,2)	2 (4,65)	NR <sup>8</sup>
<i>S. aureus</i> <sup>5</sup>	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,32)	1 (487.000)
STEP <sup>6</sup> + SCN	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (9,0)	0 (0,0)	1 (2,32)	1 (474.000)
<i>S. aureus</i> + SCN	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (9,0)	0 (0,0)	1 (2,32)	1 (919.000)
SCP <sup>7</sup>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (9,0)	0 (0,0)	1 (2,32)	1 (99.000)
STEP	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (2,32)	NR
STEP + STEN	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (2,32)	NR
STEN	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (2,32)	NR
Total	9 (100,0)	14 (100,0)	11 (100,0)	9 (100,0)	43 (100,0)	34 (265.000)

<sup>1</sup>Média Aritimética de contagem de células somáticas; <sup>2</sup>*Staphylococcus* coagulase negativo; <sup>3</sup>*Corynebacterium bovis*; <sup>4</sup>*Streptococcus* esculina negativo; <sup>5</sup>*Staphylococcus aureus*; <sup>6</sup>*Streptococcus* esculina positivo; <sup>7</sup>*Staphylococcus* coagulase positivo; <sup>8</sup> Não Realizado

### 3.4 Conclusões

O resultado da pesquisa de micro-organismos deteriorantes em pontos de contaminação do leite cru durante a ordenha das propriedades avaliadas, demonstrou altas contagens de bactérias mesófilas e coliformes em utensílios (latões/baldes) e tetos dos animais.

A avaliação da sanidade da glândula mamárias dos animais em lactação demonstrou alta frequência de isolamentos de patógenos contagiosos porem com pouca contribuição para a contagem total bacteriana.

Os resultados demonstraram a importância da adoção de boas práticas de ordenha, priorizando a lavagem adequada de baldes e latões e a desinfecção dos tetos antes da ordenha,

a fim de reduzir/eliminar a contaminação por micro-organismos deteriorantes no leite cru e melhorar a qualidade e seguridade da matéria-prima.

## REFERÊNCIAS

- BAUR, C.; KREWINKEL, M.; KRANZ, B.; NEUBECK, M.V.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 23-29, 2015.
- BRASIL, R. B.; SILVA, M. A. P.; CARVALHO, T. S.; CABRAL, J. F.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Avaliação da qualidade do leite cru em função do tipo de ordenha e das condições de transporte e armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 34-48, 2012.
- BRITO, M.A.V.P.; PORTUGAL, J.A.B.; DINIZ, F.H.; FONSECA, P.C.; ANGELO, F.F.; PORTO, M. A. C. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. In: MARTINS, C.E.; FONSECA, P. C.; BERNARDO, W. F. **Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para a produção de leite em bases sustentáveis**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 21-34, 2003.
- CARVALHO, G. L. O. **Uso da análise espacial para avaliação de indicadores de qualidade do leite na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia**, 2012. 121p. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2012.
- CERQUEIRA, M. M. O. P.; PICININ, L. C. A.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; OLIVEIRA LEITE, M.; PENNA, C. F. D. A. M.; RODRIGUES, R. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. **Perspectivas e avanços na qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Leorges\\_Fonseca/publication/267784170\\_Qualidade\\_da\\_agua\\_e\\_seu\\_impacto\\_na\\_qualidade\\_microbiologica\\_do\\_leite/links/552930a70cf2779ab78f7095.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Leorges_Fonseca/publication/267784170_Qualidade_da_agua_e_seu_impacto_na_qualidade_microbiologica_do_leite/links/552930a70cf2779ab78f7095.pdf)>. Acessado em: 16 ago. 2018.
- CHEN, L. D. R. M., DANIEL, R. M., COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, n.4, p.255-275, 2003.
- DIAS, J.A.; ANTES, F.G. **Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibióticos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2012. (Documentos, nº 150)
- DIAS, J. A.; BRITO, L.G.; BARBIERI, F. S. MOREIRA, P.; **O papel das infecções intramamárias na qualidade do leite em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. (Circular Técnica, nº 137)
- DIAS, J. A.; ANTES, F. G.; QUEIROZ, R. B. Fatores de risco associados à ocorrência de resíduos de antibióticos em leite total de rebanhos leiteiros da microrregião de Ji-Paraná do estado de Rondônia. In: Congresso internacional do leite, 13; Workshop de políticas públicas, 13; Simpósio de sustentabilidade da atividade leiteira, 14, 2015, Porto Alegre. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2015. 1 CD-ROM. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, nº 184).
- DIAS, J., GREGO, C., SILVA, F., OLIVEIRA, A., SOUZA, M. G. Análise espacial da contagem bacteriana total como ferramenta para identificação de áreas prioritárias de atuação

de indústrias lácteas. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 7. 2017. **Anais...** Curitiba: CBQL, 2017a.

DIAS, J. A.; BRITO, M. A. V. P.; MENEZES, C. A.; Resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite bovina em Rondônia. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 7. 2017. **Anais...** Curitiba: CBQL, 2017b

FAGAN, E. P.; BELOTI, V.; BARROS, M.F.; MULLER, E. E.; NERO, L.A.; SANTANA, E. H. W.; MAGNANI, D. F.; VACARELLI, E. R.; SILVA, L. C.; PEREIRA, M. S. Evaluation and implementation of good practices in main points of microbiological contamination in milk production. **Semina: Ciências Agrárias**. V. 6, n. 1, p. 83-2, 200.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.) Standard methods for the examination of dairy products. 16.ed. Washington: **American Public Health Association**, p.271- 286, 1992.

FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. **Tests for groups of microorganisms**. In: Michael, h; Frank, J. F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products 17.ed. American Public Health Association. Washington, EUA 2004.

GONZALEZ, R. N.; JASPER, D. E.; BUSHNELL, R. B.; FARVER, T. B. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 4, n. 189, 442-445, 1986.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. D. S. M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, n.1, p.216-222, 2005.

HAYS, M. C.; RALYEA, R. D.; MURPHY, S. C.; CAREY, N. R.; SCARLETT, J. M.; BOOR, K. J. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 292-298, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal 2016**. Rio de Janeiro, 2016.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. D. S.; CITADELLA, J. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; SILVA, A. V. D. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n. 12, p. 1059-1065, 2011. LOPES JUNIOR, J. E. F. **Contagem de células somáticas e liberação de bactérias de quartos mamários com mastite subclínica**, 2010. 69p. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, MG,

2010.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae*: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.38, n.7, p.429-437, 1997.

MORTON, R.D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington DC: American Public Health Association. P.63-67, 2001.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts on bovine mastitis**. 3.ed. Arlington, p.5-46, 1987.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4.ed. Verona: National Mastitis Council, 47p, 2004.

OLIVEIRA, J. T. C.; BRANDESPIM, D. F. Caracterização da higienização da ordenha de vacas leiteiras, utilizada pelos produtores no município das Correntes-PE, 2009. Disponível em: < <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/r0862-2.pdf> >. Acessado em: 20 jul. 2018.

PAIXÃO, M. G.; LOPES, M. A.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R. Impacto econômico da implantação das boas práticas agropecuárias relacionadas com a qualidade do leite. **Revista Ceres**, v. 61, n. 5, p. 612 - 621, 2015.

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D. J.; RUEGG, P. L. Factors associated with coliform count in unpasteurized bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2680-2691, 2011.

RYSANEK. D.; BABAK. V. Buk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. **Journal of Dairy Research**, v.72, n.4, p.400-405, 2005.

SANTANA, E. D.; BELOTI, V.; BARROS, M. D. A. F., MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19. 2001.

SCHALM O. W.; CARROL E.; JAIN, N. C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia: Lea and Febiger, 360p. 1971.

SEARS, P. M.; SMITH, B. S.; ENGLISH, P. B.; HERER, P. S.; GONZALEZ, R. N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.10, p.2785-2789, 1990.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Diagnóstico do Agronegócio do leite e seus Derivados no estado de Rondônia**. Porto Velho, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F.A.; TABIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R.A.R.; **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela; 2010.



SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; D'OVÍDIO, R. T. L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes de contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276. 2011.

TAVARES, A. B.; SOUZA, A. I. A.; DULAC, C. F.; MOREIRA, L. M.; DOMINGUEZ, L.; GONZALEZ, H. L.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.2, p.483-490, 2017.

ZADOKS. R.N.. GONZALEZ. R.N.. BOOR. K.J.. SCHUKKEN. Y.H. Mastitis-causing *Streptococci* are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. **Journal of Food Protection**, v.67, n.12, p.2644-2650, 2004.

## 4 MICRO-ORGANISMOS DETERIORANTES DO LEITE ARMAZENADO EM TANQUES DE RESFRIAMENTO COLETIVOS DE RONDÔNIA

### RESUMO

Considerando a importância da cadeia produtiva do leite para o estado, a baixa qualidade microbiológica evidenciada nos estudos previamente realizados e a grande diversidade de micro-organismos deletérios ao leite, o objetivo do trabalho foi avaliar a microbiota deteriorante do leite armazenado em 23 tanques coletivos da microrregião de Ji-Paraná e Cacoal. A coleta das amostras de leite foi realizada, após homogeneização, em frascos de vidro estéreis e frascos contendo conservantes, e então encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite/Embrapa Rondônia para análise laboratorial. Para a pesquisa dos micro-organismos, procedeu-se a diluição decimal seriada da amostra. Para a contagem dos micro-organismos utilizou-se semeadura em duplicata de 1 mL em placas de Petrifilm® AC aeróbios mesófilos e Petrifilm® EC coliformes totais de acordo com o fabricante. Para a contagem de psicrotróficos e termodúricos psicrotróficos, as amostras foram semeadas em duplicata pelo método de semeadura em superfície, em ágar padrão leite a 10%. Para a pesquisa de micro-organismos termodúricos mesófilos e psicrotróficos, as amostras foram submetidas ao tratamento térmico ( $62,8 \pm 0,5$  °C) e resfriada a 10 °C. A determinação da Contagem Total de Bactérias (CTB) e Contagem de Células Somáticas (CCS) foi realizada pelo método de citometria de fluxo em equipamento automatizado. Para análise dos dados, as contagens de bactérias foram convertidas em log e os resultados comparados utilizando o teste U de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. A mediana de produtores dos tanques avaliados foi de 5 variando de 2 a 19. Dos 23 tanques avaliados, 65,2% apresentaram CTB acima de 300.000 UFC/mL, limite em vigor definido pela Instrução Normativa nº 62. A mediana da contagem de mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, coliformes, termodúricos mesófilos e psicrotróficos foram respectivamente  $2,8 \times 10^5$  UFC/mL,  $6,8 \times 10^5$  UFC/mL,  $4,6 \times 10^5$  UFC/mL,  $2,0 \times 10^4$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL,  $1,3 \times 10^3$  UFC/mL. Não foi observada diferença estatística entre as contagens dos grupos de bactérias deteriorantes por tipo de microrregião e número de produtores por tanque. O resultado deste trabalho demonstra contagens de bactérias deteriorantes em tanques coletivos próximas aos limites considerados críticos para a utilização do leite para o consumo e processamento industrial.

**Palavras-chave:** Bactérias deteriorantes. Tanques coletivos. Qualidade do Leite.

## ABSTRACT

Considering the importance of the milk production chain for the state, the low microbiological quality evidenced in the previous studies and the great diversity of deleterious microorganisms in milk, the objective of this work was to evaluate the deteriorating microbiota of the milk stored in 23 collective tanks of the microregion of Ji-Paraná and Cacoal. The samples of milk were collected in sterile glass bottles and in bottles containing azidiol and bronopol preservative and then sent to the Laboratory of Quality of Milk / Embrapa Rondônia for laboratory analysis. For the analysis of the microorganisms, serial decimal dilution of the sample was performed. For the counting of the microorganisms, 1 mL duplicate seeding was used in Petrifilm™ AC aerobic mesophilic and Petrifilm™ EC coliform total plates according to the manufacturer. For the counting of psychrotrophic and psychrotrophic thermotolerants, the samples were seeded in duplicate by the surface sowing method, in standard 10% milk agar. For the study of mesophilic and psychrotrophic thermotolerant microorganisms, the samples were submitted to thermal treatment ( $62.8 \pm 0.5$  °C) and cooled to 10 °C. The determination of Total Bacterial Count (TBC) and Somatic Cell Count (SCC) was performed by the flow cytometry method in automated equipment. For analysis of the data, bacterial counts were log-plotted and the results compared using the Mann-Whitney U-test at a significance level of 5%. The median of tanks producers evaluated was 5, varying from 2 to 19. Of the 23 tanks evaluated, 65.2% had a TBC above 300,000 UFC/mL, a limit in force defined by the legislation. The median mesophilic, psychrotrophic, proteolytic, coliform, thermophilic, mesophilic and psychrotrophic counts were respectively  $2.8 \times 10^5$  UFC/ mL,  $6.8 \times 10^5$  UFC/ mL,  $4.6 \times 10^5$  UFC/mL,  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL,  $1.5 \times 10^3$  UFC/mL,  $1.3 \times 10^3$  UFC/ mL. No statistically significant difference was observed for counts of deteriorating bacteria, considering the microregion and the number of producers per tank. The result of this study shows counts of deteriorating bacteria in collective tanks near the limits considered critical for the use of milk for consumption and industrial processing.

**Key-words:** Deteriorating bacterial. Collective cooling tanks. Milk quality.

## 4.1 Introdução

A qualidade microbiológica do leite cru resulta entre outros fatores, das condições de manejo da ordenha e de estocagem e armazenamento da matéria-prima. Considerando a influência da temperatura na conservação do leite cru, foi estabelecida a obrigatoriedade do resfriamento do leite e o transporte a granel com o objetivo de conservar a sua qualidade até a recepção em estabelecimentos com inspeção sanitária oficial (BRASIL, 2002).

Para o perfil do produtor predominante no estado de Rondônia, caracterizado pela baixa escala de produção de leite, a aquisição de tanques de expansão foi considerada ponto crítico e a estratégia adotada foi a utilização de tanques de resfriamento coletivos. Esta estratégia resultou em aumento na adoção desta tecnologia pelos produtores de 6,8% em 2006 (IBGE, 2006) para 68% em 2013 (IDARON, 2013), o que refletiu no aumento do leite industrializado no estado. De acordo com os dados obtidos pelo serviço de defesa sanitária animal oficial do estado em 2017, 89,5% do leite resfriado recebido pela indústria está armazenado em tanques de resfriamento coletivos (IDARON, 2017).

Embora tenham sido observados avanços estruturais com foco na melhoria da qualidade do leite em Rondônia, com a aquisição de tanques de resfriamento, melhoria das estradas e qualidade da energia elétrica, ainda são observados indicadores insatisfatórios de qualidade microbiológica do leite, em grande parte devido à baixa adoção de boas práticas agropecuárias e a deficiente logística para o resfriamento do leite (CARVALHO, 2012; DIAS et al., 2015).

Em estudo realizado por Dias et al. (2015) na microrregião de Ji-Paraná, RO, foi avaliada a qualidade microbiológica do leite total de 266 rebanhos, e observaram que 195 (73,0%) apresentaram CTB > 100.000 UFC/mL, limite final estabelecido pela IN7 para a região Norte/Nordeste. Neste trabalho, a entrega do leite no tanque comunitário realizada por carreteiro foi considerada fator de risco para CTB > 100.000 UFC/mL, demonstrando que esta prática associada a falhas de manejo e alta temperatura da região contribui para a baixa qualidade do leite. Neste trabalho também foram avaliados 73 tanques de resfriamento e o resultado da distribuição dos resultados de CTB demonstrou mediana de 196.500 UFC/mL e 965.000 UFC/mL para tanques individuais e coletivos respectivamente, demonstrando a importância de conhecer as variáveis associadas à baixa qualidade do leite em tanques de uso comunitário da região. Resultados obtidos por Carvalho. (2012) em 2011 na microrregião de Ji-Paraná/RO demonstraram médias de CTB estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) no período chuvoso em comparação com período seco sendo a média geométrica de CTB de 724.000 UFC/mL e 631.000 UFC/mL, respectivamente.

Diferentes grupos de micro-organismos podem compor a microbiota deteriorante do leite. Os aeróbios mesófilos incluem um grupo de micro-organismos capazes de se multiplicarem numa faixa de temperatura entre 20 e 45 °C, e encontrando nas temperaturas ambientes condições ótimas para o seu metabolismo (FRANCO; LANDGRAF, 2003). São fermentadores de lactose produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos, o que causa a acidez do leite (BRITO et al., 2003). O resfriamento do leite após a ordenha reduz significativamente a multiplicação dos aeróbios mesófilos, porém, favorece a multiplicação da microbiota psicotrófica (SANTANA et al., 2001). Bactérias psicotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7 °C, sendo os principais agentes de deterioração do leite cru refrigerado e de seus derivados (FRANK et al., 1992).

Considerando a importância da cadeia produtiva do leite para o estado de Rondônia, os desafios para o atendimento aos parâmetros definidos na legislação para a qualidade microbiológica do leite cru armazenado em tanques coletivos e a grande diversidade de micro-organismos deletérios ao leite pasteurizado, UHT e derivados, este trabalho teve o objetivo de avaliar a microbiota deteriorante do leite armazenado em tanques de resfriamento coletivos localizados nas duas principais microrregiões produtoras de leite do estado.

## **4.2 Material e Métodos**

### ***4.2.1 Locais e período do estudo***

Foram avaliados 23 tanques coletivos, sendo 10 localizados na microrregião de Ji-Paraná e 13 localizados na microrregião de Cacoal, Estado de Rondônia, no período de março a abril de 2017.

### ***4.2.2 Coleta das amostras e dados***

As amostras de leite foram coletadas de tanques de resfriamento coletivo, após homogeneização do leite, da parte superior e central do tanque e acondicionadas em frascos de vidro estéreis para a pesquisa de micro-organismos deteriorantes e em frascos contendo conservante azidiol e bronopol para a determinação da contagem bacteriana total (CTB) e contagem de células somáticas (CCS) respectivamente. Os frascos foram identificados e armazenados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhados imediatamente para o Laboratório de Qualidade do Leite na Embrapa Rondônia para análise laboratorial.

No momento da coleta das amostras de leite, foi aplicado um questionário epidemiológico ao responsável do tanque, a fim de obter informações relacionadas às características gerais do tanque, limpeza e manutenção, logística de resfriamento e análises do leite realizadas. Os tanques de resfriamento selecionados foram georreferenciados por meio de equipamento de GPS (*Global Positioning System*).

#### **4.2.3 Diagnóstico microbiológico e indicadores higiênico-sanitário**

Para a pesquisa de micro-organismos deteriorantes, as amostras de leite dos tanques coletivos foram diluídas serialmente em escala decimal utilizando solução salina esterilizada 0,85%. As diluições selecionadas para cada micro-organismo foram semeadas em duplicata em placas Petrifilm<sup>®</sup> AC (para aeróbios mesófilos) e Petrifilm<sup>®</sup> EC (para coliformes totais e *E. coli*), seguindo os procedimentos descritos por Morton (2001) e interpretadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a contagem de psicrotróficos e termodúrico psicrotróficos foi utilizado o método de semeadura em superfície, em duplicata, em ágar padrão para contagem (PCA) acrescido de leite em pó à 10%, e incubados a 7 °C por 10 dias conforme procedimento descrito por Frank e Yousef (2004). Para a determinação da contagem de termodúricos, foi realizado o preparo térmico da amostra antes de proceder a diluição das amostras de leite. Para isso, uma alíquota de 5 mL de da amostra de leite foi incubada em banho-maria a 62,8 °C por 30 minutos.

Para a contagem de termodúrico mesófilo, foi utilizado o método em superfície em PCA. As placas foram incubadas a 37 °C por 48-72 horas de acordo com Frank e Yousef (2004).

A determinação da CCS e CTB foi realizada pelo método de citometria de fluxo em equipamento automatizado (CombiScope FTIR400 - Delta Instruments) e Bentley IBC<sup>®</sup> (BENTLEY INSTRUMENTS INC., 2007), respectivamente, de acordo com a International Dairy Federation (IDF, 2006).

#### **4.2.4 Análise dos dados**

As informações do questionário epidemiológico e os resultados da pesquisa de micro-organismos deteriorantes e determinação de CTB e CCS foram armazenados em um banco de dados do programa Epiinfo 3.5.3. A análise de frequência e estatística descritiva foi realizada utilizando o programa Epiinfo 3.5.3. Para análise dos dados, as contagens de bactérias foram convertidas em log e os resultados comparados utilizando o teste U de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

## 4.3 Resultados e Discussão

### 4.3.1 Caracterização dos tanques de resfriamento coletivos

As características gerais dos tanques coletivos avaliados estão apresentadas na Tabela 6. Dos tanques avaliados, somente um tanque da microrregião de Cacoal não possuía edificação própria, sendo localizado na varanda da casa do produtor responsável. As edificações eram de forma predominante construídas de alvenaria (87,5%) nos tanques localizados na microrregião de Ji-Paraná e de madeira (53,8%) nos tanques da microrregião de Cacoal. Nos tanques avaliados, foi observada a presença de pontos de água em 87% das edificações, sendo a fonte de água mais frequente utilizada de poço na microrregião de Ji-Paraná e de nascentes na microrregião de Cacoal. Em 22 tanques avaliados (95,6%), havia vulnerabilidade quanto a entrada de pessoas estranhas.

A mediana de produtores de leite por tanque coletivo foi 5, variando de 2 a 19. A capacidade dos tanques estudados era superior à quantidade recebida, sendo a mediana da capacidade dos tanques e volume de leite recebido por dia de 1.000 litros e 159 litros, respectivamente para a microrregião de Ji-Paraná, e de 1.010 litros e 257 litros, respectivamente para a microrregião de Cacoal (Tabela 7). A mediana da distância da propriedade ao tanque coletivo foi de 50 metros, variando de 0 a 5.000 metros. As maiores distâncias entre propriedade e tanque de resfriamento foram verificadas na microrregião de Cacoal, nas situações em que a entrega do leite era realizada por intermediários/carreiros (n=3).

As variáveis relacionadas a limpeza e manutenção do tanque e logística de resfriamento do leite estão apresentadas na Tabela 8. A limpeza do tanque era realizada de forma predominante pelo produtor, e em 50 % (5/10) dos tanques (Ji-Paraná) e 45,4% (5/13) (Cacoal) a limpeza era realizada exclusivamente por mulheres. Para a limpeza, o detergente neutro era utilizado em 91% dos tanques, utilizando de forma predominante vassoura (Ji-Paraná) ou esponja sintética (Cacoal) em condições regulares de conservação. Considerando a condição geral, nove tanques (39,1%) foram considerados limpos.

A entrega do leite no tanque era realizada de forma predominante pelo produtor. A entrega do leite no tanque por intermediários/carreiros foi verificada em três dos tanques avaliados localizados na microrregião de Cacoal. Nestes tanques, o carreiro era responsável pela lavagem dos latões e posterior entrega aos produtores, permanecendo o latão nas bancas instaladas nas margens da estrada e expostos a poeira e outras variáveis climáticas. A lavagem dos latões era realizada na área do tanque de forma deficiente e sem estrutura adequada. Dias

et al. (2016), relataram que a presença do intermediário está relacionada a distância entre a propriedade e o tanque, o tempo entre o fim da ordenha e a entrega do leite no tanque contribuindo para um maior tempo para o resfriamento do leite e falhas na limpeza e devolução dos latões, refletindo em altas contagens de bactérias.

De acordo com os responsáveis dos tanques, o teste do alizarol era realizado no momento da entrega do leite em apenas dois tanques, e sem regularidade na execução do teste. Em todos os tanques era realizada a coleta de amostras para análise físico-química e determinação dos indicadores higiênico-sanitários e composicionais, entretanto o retorno dos resultados ao produtor responsável pelo tanque era realizado somente nos tanques localizados na microrregião de Cacoal. Quanto ao conhecimento relacionado à Instrução Normativa n° 62 (IN62), somente dois produtores responsáveis por tanques relataram ter conhecimento sobre a legislação.

**Tabela 6** - Características gerais dos tanques de resfriamento coletivos avaliados, microrregião de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017.

Variável	Categoria	Microrregião Ji-Paraná		Microrregião Cacoal	
		n	%	n	%
<i>Características gerais do tanque</i>					
Edificação para o tanque	Sim	10	100	11	84,6
	Não	-	-	2	15,4
Material da edificação	Madeira	1	12,5	7	53,8
	Alvenaria	7	87,5	4	30,8
	Varanda da casa	-	-	2	15,4
Piso da edificação	Cerâmica	5	50,0	6	46,2
	Cimento	4	40,0	4	30,8
	Cimento queimado	1	10,0	3	23,1
Parede da edificação	Cimento	5	50,0	3	23,1
	Tijolo	2	20,0	1	7,7
	Madeira	3	30,0	7	53,8
Ponto de água na edificação	Sem parede	-	-	2	15,4
	Sim	8	80,0	12	92,3
Fonte da água	Não	2	20,0	1	7,7
	Poço Amazônico	6	60,0	3	27,3
Tratamento da água	Nascente	4	40,0	8	72,7
	Sim	2	33,3	2	20,0
Material para coar o leite na entrada do tanque	Não	4	66,7	8	80,0
	Sim	4	40,0	2	15,4
Estrutura vulnerável para entrada de pessoas estranhas	Não	6	60,0	11	84,6
	Sim	10	100,0	12	92,3
	Não	-	-	1	7,7



**Tabela 7** - Distribuição das variáveis relacionadas às características gerais e logística de resfriamento dos tanques de resfriamento avaliados, microrregião de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017.

Variáveis	Microrregião de Ji-Paraná					Microrregião de Cacoal				
	N <sup>1</sup>	Média	Mín. - Máx. <sup>2</sup>	Mediana	Q1 - Q3 <sup>3</sup>	N	Média	Mín. - Máx.	Mediana	Q1 - Q3
<b>Característica geral do tanque</b>										
Número de produtores	10	5	2 - 9	5	4 - 5	12	7	2 - 19	5	2 - 12
Capacidade do tanque (litros)	10	936	500 - 1.950	1000	500 - 1.120	13	1.238	350 - 2.200	1.010	1.000 - 1.775
Volume de leite recebido (litros/dia)	9	202	66 - 500	159	121 - 255	10	293	52 - 620	257	135 - 428
<b>Logística de resfriamento</b>										
Distância mínima da propriedade ao tanque (m)	5	80	50 - 150	50	50 - 125	11	123	0 - 400	50	0 - 300
Distância máxima da propriedade ao tanque (m)	5	830	200 - 2000	700	225 - 1500	11	1.977	200 - 5.000	1.500	600 - 3.000

<sup>1</sup> Número de tanques avaliados; <sup>2</sup> Mínimo - Máximo; <sup>3</sup> 1º Quartil - 3º Quartil

**Tabela 8** - Variáveis relacionadas à limpeza e manutenção, logística de resfriamento do leite e das análises de amostras de leite realizadas em tanques coletivos, microrregião de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017.

Variável	Categoria	Microrregião Ji-Paraná		Microrregião Cacoal	
		n	%	n	%
<i>Limpeza e manutenção do tanque coletivo</i>					
Responsável pela limpeza do tanque	Proprietário	8	80,0	11	100,0
	Encarregado	2	20,0	-	-
Sexo do responsável	Feminino	5	50,0	5	45,4
	Masculino	4	40,0	3	27,3
	Ambos	1	10,0	3	27,3
Treinamento para limpeza do tanque	Sim	1	10,0	6	54,5
	Não	9	90,0	5	45,5
	Neutro	10	100,0	11	84,6
Tipo de detergente	Caseiro	-	-	1	7,7
	Alcalino	-	-	1	7,7
	Escova para tanques	3	30,0	2	15,4
Utensílios utilizados	Espunja sintética	1	10,0	6	46,2
	Vassoura	5	50,0	4	30,8
	Outros	1	10,0	1	7,7
	Bom	2	20,0	3	23,1
Condição dos utensílios	Regular	5	50,0	7	53,8
	Ruim	3	30,0	3	23,1
	Limpo	4	40,0	5	45,4
Condição de limpeza do tanque	Interno - limpo; Externo- sujo	4	40,0	4	36,4
	Sujo	2	20,0	2	18,2
	Limpo e seco	6	66,7	1	11,2
Condição de limpeza da edificação	Limpo e molhado	2	22,2	4	44,4
	Sujo	1	11,1	4	44,4
<i>Logística de resfriamento do leite</i>					
Entrega do leite no tanque	Produtor	10	100,0	10	76,9
	Intermediário/carreteiro	-	-	3	23,1
Responsável pela higienização do latão de leite	Produtor	10	100,0	10	76,9
	Intermediário/carreteiro	-	-	3	23,1
Periodicidade da captação do leite pela indústria	48 horas	10	100,0	11	100,0
	Bom	4	40,0	1	7,7
Condições da estrada de acesso ao tanque	Regular	5	50,0	9	69,2
	Ruim	1	10,0	2	15,4
<i>Análises do leite e conhecimento da legislação</i>					
Teste do alizarol na recepção do leite no tanque	Sim	1	10,0	1	8,3
	Não	9	90,0	11	91,7
Capacitação para realização do teste do alizarol	Sim	-	-	4	30,8
	Não	10	100,0	9	69,2
Análises do leite do tanque	Sim	10	100,0	13	100,0
	Informa e faz recomendações	-	-	11	84,6
Retorno dos resultados laboratoriais	Não informa	10	100,0	2	15,4
	Sim	1	10,0	1	7,7
Conhecimento da Instrução Normativa 62	Sim	1	10,0	1	7,7
	Não	9	90,0	12	92,3

### ***4.3.2 Pesquisa de micro-organismos deteriorantes e indicadores de qualidade do leite***

Na Tabela 9 está apresentada a distribuição dos resultados da CTB e CCS em amostras de leite armazenado nos tanques coletivos avaliados. Os resultados da distribuição da CCS entre os tanques avaliados, demonstraram o atendimento aos limites vigentes estabelecidos pela IN62 para este indicador (500.000 céls/mL). Dos 23 tanques de resfriamento avaliados, 21 (91,3%) apresentaram CCS abaixo de 500.000 céls/mL.

Os resultados da avaliação da CTB dos tanques coletivos avaliados demonstraram contagens acima dos limites atuais estabelecidos pela IN7. Dos 23 tanques coletivos avaliados, 65,2% apresentaram CTB acima de 300.000 UFC/mL, limite em vigor definido pela legislação. A mediana dos resultados de CTB foi de 415.000 UFC/mL para as amostras de tanque da microrregião de Ji-Paraná e 555.000 UFC/mL para tanques da microrregião de Cacoal, não sendo observada diferença estatística da CTB entre as regiões ( $p > 0,05$ ).

Estudos realizados em Rondônia demonstraram alta frequência de tanques de resfriamento coletivos acima do limite estabelecido para a CTB. Resultados obtidos por Carvalho (2012) na microrregião de Ji-Paraná/RO demonstraram médias de CTB em tanques de resfriamento estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) no período chuvoso em comparação com período seco sendo a média geométrica de CTB de 724.000 UFC/mL e 631.000 UFC/mL, respectivamente. Dias et al. (2014) avaliaram 73 tanques de resfriamento localizados na microrregião de Ji-Paraná/RO e o resultado da distribuição dos resultados de CTB demonstrou mediana de 196.500 UFC/mL e 965.000 UFC/mL para tanques individuais e coletivos respectivamente, demonstrando a importância de conhecer os fatores de risco associados à baixa qualidade do leite em tanques de uso comunitário da região.

Estudo realizado por Dias et al. (2017), avaliaram espacialmente os resultados das análises oficiais de CTB de tanques de resfriamento vinculados a dois laticínios no estado de Rondônia, e demonstrou média geométrica de CTB em tanques coletivos de 732.000 UFC/mL e 515.000 UFC/mL. Nas áreas prioritárias, a presença de intermediários na entrega do leite no tanque foi considerada ponto crítico para ocorrência de resultados de CTB acima dos estabelecidos pela legislação.

O resultado da avaliação de micro-organismos deteriorantes em amostras de leite cru armazenados em tanques de resfriamento coletivo, demonstrou mediana da contagem de mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, coliformes, termodúricos mesófilos e psicrotróficos de  $2,8 \times 10^5$  UFC/mL,  $6,8 \times 10^5$  UFC/mL,  $4,6 \times 10^5$  UFC/mL,  $2,0 \times 10^4$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL,  $1,3 \times 10^3$  UFC/mL respectivamente (Tabela 10). Não foi observada diferença

estatística entre a contagem dos grupos de bactérias e microrregiões, e entre o número de produtores por tanque ( $p > 0,05$ ).

A alta contagem de bactérias deteriorantes em leite armazenado em tanques coletivos pode estar relacionada a fatores como infraestrutura deficiente e baixa adoção de boas práticas de ordenha nas propriedades do estado (CARVALHO, 2012; DIAS, et al., 2015, SEBRAE, 2015; DIAS et al., 2017a) e falhas na logística de resfriamento associado a deficiências nos procedimentos de limpeza e manutenção de tanques de resfriamento (DIAS, et al., 2014).

Estudos realizados em diferentes regiões de Rondônia demonstra a ocorrência de altas contagens de bactérias quando a entrega do leite no tanque é realizada por intermediários/carreiros (DIAS et al., 2013; DIAS, et al., 2015; DIAS et al., 2017a). No presente trabalho, nos tanques coletivos em que a entrega do leite era realizada por carreiros, foram observadas altas contagens de todos os grupos de micro-organismos avaliados, com mediana da contagem de micro-organismos de  $2,35 \times 10^6$  UFC/mL para mesófilos,  $1,3 \times 10^6$  UFC/mL para psicrotóxicos,  $1,1 \times 10^6$  UFC/mL para psicrotóxicos proteolíticos e  $4,25 \times 10^5$  UFC/mL para coliformes totais. A distribuição dos resultados de mesófilos, psicrotóxicos e coliformes de acordo com o tipo de entrega do leite nos tanques de resfriamento está demonstrado na Figura 2.

A mediana da contagem de micro-organismos mesófilos foi de  $2,8 \times 10^5$  UFC/mL, variando de  $4,7 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^7$  UFC/mL. Arcuri et al. (2006) relataram que dentre os fatores que contribuem para redução das contagens de mesófilos no leite armazenado em tanques de resfriamento estão a adoção de procedimentos de limpeza e estocagem do leite a  $4^\circ\text{C}$ .

Estudos realizados no Brasil demonstram elevada contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos em amostras de leite de tanques coletivos (BRITO et al., 2003; ARCURI et al., 2006; SILVA et al., 2011). De acordo com Bueno (2004), a utilização de tanques comunitários pode acumular falhas individuais, o que prejudica a qualidade do leite de conjunto. Além disso, existem tanques comunitários que ficam distantes de algumas propriedades e os produtores realizam a entrega do leite à carreiros em um ponto comum, o que cria mais um passo no transporte e pode estar sujeito a atrasos, sendo um fator que contribui para a demora na entrega do leite no tanque, contribuindo para o aumento da multiplicação microbiana no leite, principalmente nos meses mais quentes do ano (BRITO et al., 2003). O estudo realizado por Silva et al. (2011) relatou que a entrada constante de leite em temperatura ambiente no tanque, leva a redução da eficiência da refrigeração.

Foram observadas altas contagens de psicrotóxicos e psicrotóxicos proteolíticos nas amostras de leite de tanque avaliadas. Embora não tenham parâmetros definidos para a

contagem de psicrotróficos na legislação, Pinto et al. (2006) relataram que a fabricação de produtos a partir do leite cru com valores acima de  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL torna-se inadequado. A proteólise causada por enzimas de bactérias psicrotróficas está associada a problemas como gelificação do leite UHT, aumento da taxa de sedimentação, redução do rendimento dos queijos, levando ao comprometimento da qualidade, redução da vida de prateleira e consequentes prejuízos financeiros para a indústria (SØRHOUG; STEPANIAK, 1997; SOUSA et al., 2007).

A presença de coliformes são indicativos de contaminação ambiental ou até mesmo de resíduos fecais, sendo sua presença no leite indicativa de falta de higiene durante a ordenha, no armazenamento ou transporte do leite (SILVEIRA; BERTAGNOLI, 2014). A mediana da contagem de coliformes nas amostras de leite avaliadas foi de  $2,2 \times 10^4$  UFC/mL e  $2,0 \times 10^4$  UFC/mL para as microrregiões de Ji-Paraná e Cacoal respectivamente, indicando falhas na obtenção higiênica do leite e na lavagem de utensílios e tanques de resfriamento. Pantoja et al. (2011) estudando os fatores associados às contagens de coliformes em leite cru observou que falhas nos procedimentos de higienização de equipamentos de ordenha e queda das teteiras durante a ordenha foram associados ao aumento de coliformes, demonstrando a importância da manipulação e higienização adequada de equipamentos de ordenha. A presença de *E. coli* foi demonstrada nas amostras de leite de tanque avaliadas, indicando condições higiênicas inadequadas de obtenção do leite e forte indicativo de contaminação fecal.

Os micro-organismos termodúricos, se caracterizam por resistirem à pasteurização (FRANCO; LANDGRAF, 2003). No leite, esses micro-organismos também podem ser psicrotróficos proteolíticos e/ou lipolíticos, deteriorando o leite pasteurizado (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2013). No leite os principais gêneros esporulados são os *Bacillus* e os *Paenibacillus*, pois possuem características psicrotróficas e/ou termodúricas capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração e resistirem à pasteurização atravessando toda cadeia do leite (BELOTI, 2015). A mediana da contagem de micro-organismos termodúricos mesófilos nas amostras avaliadas foi de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL variando de  $9,5 \times 10^1$  UFC/mL e  $2,7 \times 10^5$  UFC/mL e termodúricos psicrotróficos foi  $1,3 \times 10^3$  UFC/mL variando de 0 a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL. Devido a ampla distribuição de micro-organismos termodúricos no ambiente, os resultados demonstram a importância de estratégias para reduzir/eliminar a contaminação microbiológica e melhorar a qualidade e segurança da matéria-prima.

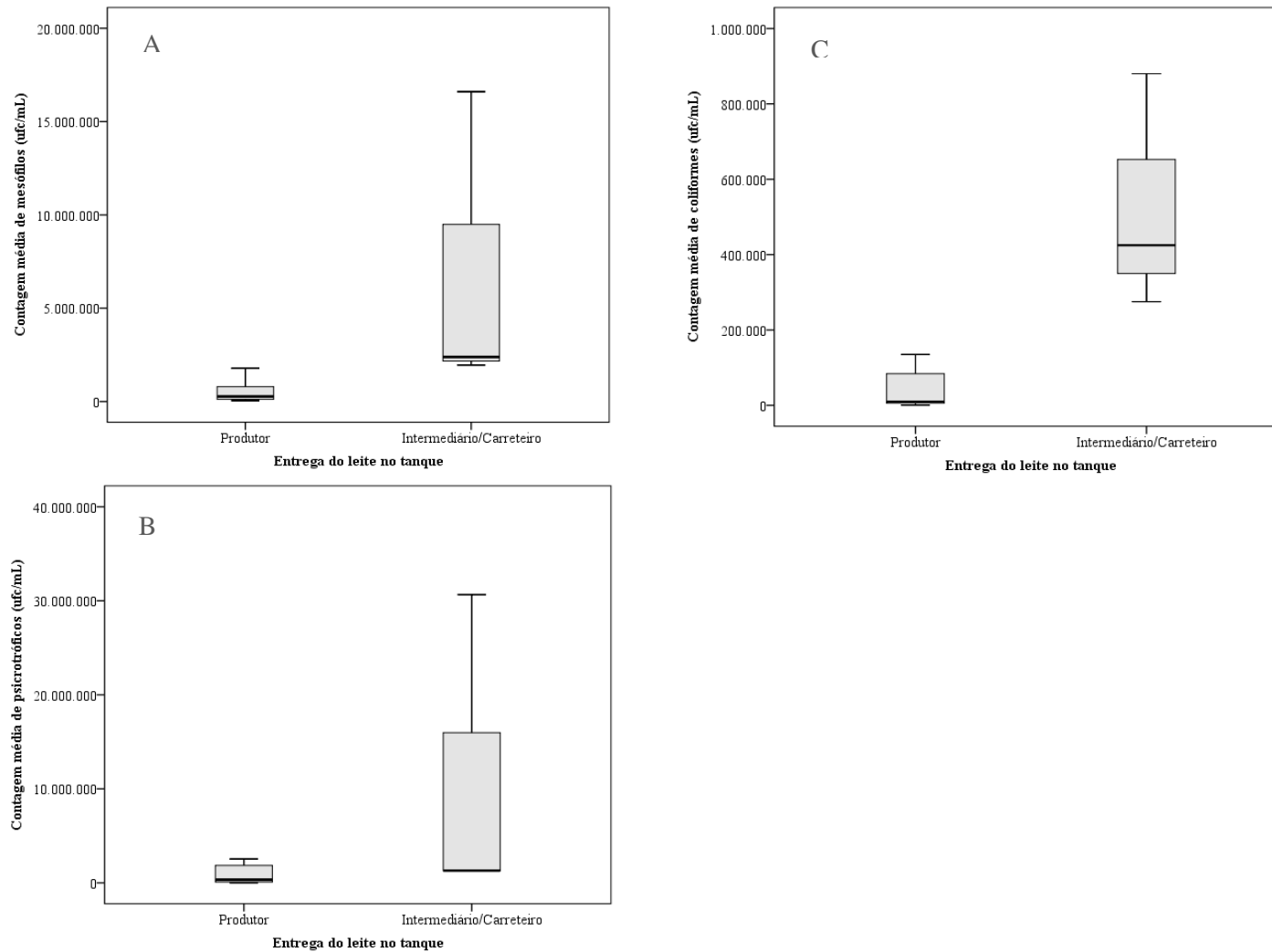
**Tabela 9** - Distribuição dos resultados da contagem total de bactérias (UFC/mL\*1000) e contagem de células somáticas (céls/mL\*1000) de amostras de leite armazenado em tanques de resfriamento coletivos, microrregiões de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017.

Indicadores	Microrregião de Ji-Paraná					Microrregião de Cacoal				
	N	Média	Mín. - Máx.	Mediana	Q1 - Q3	N	Média	Mín. - Máx.	Mediana	Q1 - Q3
Contagem Total de Bactérias (UFC/mL*1000)	10	745	42 - 2164	415	253 - 1504	13	1.081	51 - 2676	555	203 - 2350
Contagem de Células Somáticas (céls/mL*1000)	10	262	112 - 510	228	174 - 335	13	268	8 - 548	2.556	148 - 388

**Tabela 10** - Distribuição dos resultados dos micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, coliformes, *E. coli*, termodúricos mesófilos e psicrotróficos em amostras de leite de tanques de resfriamento coletivos, microrregiões de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017.

Microrganismos	Microrregião de Ji-Paraná					Microrregião de Cacoal				
	N	Média	Mín. - Máx.	Mediana	Q1 - Q3	N	Média	Mín. - Máx.	Mediana	Q1 - Q3
Aeróbios mesófilos	10	5,4x10 <sup>5</sup>	9,1x10 <sup>4</sup> - 1,4x10 <sup>6</sup>	3,5x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>5</sup> - 8,1x10 <sup>5</sup>	13	2,0x10 <sup>6</sup>	4,7x10 <sup>4</sup> - 1,6x10 <sup>7</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	9,6x10 <sup>4</sup> - 2,1x10 <sup>6</sup>
Psicrotróficos	10	3,8x10 <sup>6</sup>	1,0 x10 <sup>5</sup> - 1,6x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>5</sup> - 7,5x10 <sup>6</sup>	13	2,9x10 <sup>6</sup>	4,0x10 <sup>3</sup> - 3,0x10 <sup>7</sup>	4,6x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>4</sup> - 1,3x10 <sup>6</sup>
Psicrotróficos proteolíticos	10	8,8x10 <sup>5</sup>	4,2x10 <sup>4</sup> - 3,8x10 <sup>6</sup>	6,2x10 <sup>5</sup>	9,7x10 <sup>4</sup> - 1,0x10 <sup>6</sup>	13	2,8x10 <sup>6</sup>	0 - 3,0x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	0 - 1,2x10 <sup>6</sup>
Coliformes	10	7,2x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>3</sup> - 3,3x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>3</sup> - 1,3x10 <sup>5</sup>	13	1,4x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>2</sup> - 8,8x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>4</sup>	7,7x10 <sup>3</sup> - 2,0x10 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i>	10	2,5x10 <sup>2</sup>	0 - 1,2x10 <sup>3</sup>	0	0 - 5,5x10 <sup>2</sup>	13	7,7x10 <sup>2</sup>	0 - 3,9x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>1</sup>	0 - 1,3x10 <sup>3</sup>
Termodúricos mesófilos	10	9,3x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>2</sup> - 5,0x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>2</sup> - 1,0x10 <sup>4</sup>	13	3,6x10 <sup>4</sup>	9,5x10 <sup>1</sup> - 2,7x10 <sup>5</sup>	3,9x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>2</sup> - 2,4x10 <sup>4</sup>
Termodúricos psicrotróficos	10	1,4x10 <sup>4</sup>	0 - 1,0x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>2</sup> - 1,1x10 <sup>4</sup>	13	7,5x10 <sup>3</sup>	0 - 7,2x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	0 - 6,2x10 <sup>3</sup>

**Figura 2** - Distribuição dos resultados de micro-organismos mesófilos (A), psicrotróficos (B) e coliformes (C) em amostras de leite de tanques coletivos de acordo com o tipo de entrega do leite no tanque, microrregiões de Ji-Paraná e Cacoal, Rondônia, 2017.



#### 4.4 Conclusões

A caracterização dos tanques de resfriamento coletivos avaliados demonstrou falhas na execução dos procedimentos de limpeza e manutenção dos equipamentos, na logística de resfriamento do leite e na execução de análises, como o alizarol, na recepção do leite no tanque, contribuindo para a baixa qualidade microbiológica da matéria-prima.

O resultado da avaliação dos indicadores de qualidade do leite em amostras de leite dos tanques coletivos demonstrou adequação aos limites de CCS, e um grande desafio quanto ao atendimento aos limites definidos para CTB.

A avaliação da microbiota deteriorante do leite armazenado em tanques coletivos da microrregião de Ji-Paraná e Cacoal, demonstrou a ocorrência de altas contagens dos grupos de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, coliformes e termodúricos.

A distribuição dos resultados da contagem dos principais micro-organismos deteriorantes em tanques de resfriamento em que a entrega do leite era realizada por intermediários/carreiros demonstrou a importância de definir estratégias para adequação da logística de resfriamento do leite.



## REFERÊNCIAS

- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Editora Planta, Londrina. 488 p., 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru Refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.
- BRITO, M.A.V.P.; PORTUGAL, J.A.B.; DINIZ, F.H.; FONSECA, P.C.; ANGELO, F.F.; PORTO, M. A. C. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. In: MARTINS, C.E.; FONSECA, P. C.; BERNARDO, W. F. **Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para a produção de leite em bases sustentáveis**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 21-34, 2003.
- BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; NEVES, R. B.; MANSUR, J. R. Influência da temperatura de armazenamento e do sistema de utilização do tanque de expansão sobre a qualidade microbiológica do leite cru. **Revista Higiene alimentar**, v. 18, n. 124, p. 62-67, 2004.
- CARVALHO, G. L. O. **Uso da análise espacial para avaliação de indicadores de qualidade do leite na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia**, 2012. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 121p.
- DIAS, J. A.; BRITO, L.G.; BARBIERI, F. S. MOREIRA, P.; **O papel das infecções intramamárias na qualidade do leite em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. (Circular Técnica, nº 137)
- DIAS, J.D.; ANTES, F. B.; QUEIROZ, R. B.; MENDES, M. M. **Qualidade do leite armazenado em tanques de resfriamento de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2014. (Comunicado Técnico, nº 393)
- DIAS, J. A.; ANTES, F. G.; QUEIROZ, R. B. Fatores de risco associados à ocorrência de resíduos de antibióticos em leite total de rebanhos leiteiros da microrregião de Ji-Paraná do estado de Rondônia. In: Congresso internacional do leite, 13; Workshop de políticas públicas, 13; Simpósio de sustentabilidade da atividade leiteira, 14, 2015, Porto Alegre. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2015. 1 CD-ROM. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, nº 184).
- DIAS, J.A.; ANTES, F., G.; QUEIROZ, R. B.; SOUZA, G.N.; GREGO, C.R. Distribuição espacial e fatores de risco associados à contagem total bacteriana em amostras de leite total de rebanhos do estado de Rondônia. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 6. 2015, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBQL, 2015. p. 123-124.
- DIAS, J. A.; SOUZA, M. G.; GREGO, C.; MENDES, A. **Impacto da iniciativa de pagamento por qualidade do leite sobre indicadores higiênico-sanitários de tanques de resfriamento de leite**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2016. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, nº 78)

DIAS, J., GREGO, C., SILVA, F., OLIVEIRA, A., SOUZA, M. G. Análise espacial da contagem bacteriana total como ferramenta para identificação de áreas prioritárias de atuação de indústrias lácteas. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 7. 2017. **Anais...** Curitiba: CBQL, 2017a.

DIAS, J. A.; BRITO, M. A. V. P.; MENEZES, C. A.; Resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite bovina em Rondônia. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 7. 2017. **Anais...** Curitiba: CBQL, 2017b.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2ª ed. Atheneu: São Paulo, 2003.182 p.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.) Standard methods for the examination of dairy products. 16.ed. Washington: **American Public Health Association**, p.271- 286, 1992.

FRANK, J. F; YOUSEF, A. E. **Tests for groups of microorganisms**. In: Michael, h; Frank, J. F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products 17.ed. American Public Health Association. Washington, EUA 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**.

IDARON. Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do estado de Rondônia. Relatório 34ª Etapa de campanha de vacinação Febre Aftosa. 2013. Disponível em: <<http://www.idaron.ro.gov.br/Portal/Handler.ashx?OP=6&ID=50>>. Acessado em: 20 jul. 2018.

IDARON. Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do estado de Rondônia. Relatório 43ª Etapa de campanha de vacinação Febre Aftosa. 2017. Disponível em: <<http://www.idaron.ro.gov.br/Portal/Handler.ashx?OP=6&ID=141>>. Acessado em: 28 abr. 2018.

MORTON, R.D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington DC: American Public Health Association. P.63-67, 2001.

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D. J.; RUEGG, P. L. Factors associated with coliform count in unpasteurized bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2680-2691, 2011.

PINTO, C. L.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Microbial quality of raw refrigerated milk and isolation of psychrotrophic proteolytic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

RANIERI, M. L.; IVY, R. A.; MITCHELL, W.R.; CALL, E.; MASIELLO, S .N.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. **Applied and Environmental Microbiology, Washington**, v. 78, n. 16, p. 5855-5863, 2012.

RIBBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R. Avaliação da qualidade microbiológica e físicoquímica do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 5-11, 2013.

SANTANA, E. D.; BELOTI, V.; BARROS, M. D. A. F., MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Diagnóstico do Agronegócio do leite e seus Derivados no estado de Rondônia**. Porto Velho, 2015.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; D'OVIDIO, R. T. L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes de contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276. 2011.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 2, p. 75-80, 2014.

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, A. G.; NORONHA.; C. J.; FIGUEIREDO, F. S.; CRUZ, A. F. Influência da qualidade do leite sobre os custos de uma indústria de laticínios em Goiás. In: Congresso da SOBER, 14., Londrina, 2007. **Anais...**Londrina: SOBER, 2007. Disponível <<http://www.sober.org.br/palestra/6/192.pdf>>. Acessado em: 20 jul. 2018.

## **5 CONCLUSÕES GERAIS**

A avaliação dos micro-organismos deteriorantes em pontos de contaminação durante a ordenha de propriedades que representam os sistemas produtivos prevalentes no estado permitiu a determinação de sua origem na unidade produtora e o seu comportamento em tanques de resfriamento coletivos.

As informações obtidas poderão orientar a definição de estratégias para o controle, redução e/ou eliminação desses micro-organismos contribuindo para a melhoria da qualidade e segurança do leite produzido.