

CAPÍTULO 2

Microbiologia do leite



Neste capítulo são estudados os microrganismos que podem estar presentes no leite cru e nos diversos produtos lácteos. Ao mesmo tempo, é analisada a transcendência que têm, em laticínios, os diferentes grupos microbianos.

TAXA TOTAL, TIPO E ORIGEM DE BACTÉRIAS DO LEITE CRU

Por sua composição química, o leite é um alimento de extremo valor na dieta humana, mas, pela mesma razão, constitui excelente substrato para o crescimento de grande diversidade de microrganismos heterótrofos que, como o homem, utilizam os princípios nutritivos presentes nesse alimento. A atividade de alguns microrganismos que contaminam o leite é claramente benéfica para o homem, visto que eles participam ativamente das mudanças físicas, químicas e organolépticas que ocorrem no leite ao se preparar os diversos produtos lácteos por ele consumidos. Por outro lado, a atividade microbiana incontrolada é prejudicial e leva à alteração deste, tornando-o inadequado para o consumo. Em outros casos, os microrganismos patogênicos presentes no leite podem causar graves problemas à saúde humana.

O leite, mesmo o que procede de animais saudáveis, sempre contém uma série de microrganismos cuja taxa é muito variável (10^3 - 10^6 fc/mL), dependendo das medidas higiênicas que tenham sido adotadas durante a ordenha e das condições de armazenamento na granja, nos centros regionais de coleta e nas centrais. A taxa e os tipos de microrganismos que o leite cru possui ao chegar à central decorrem de três fontes principais: o interior do úbere, o exterior do úbere e os equipamentos e outros utensílios utilizados em laticínios.

É difícil saber a procedência dos microrganismos mediante as contagens microbianas. A contagem total de aeróbios nunca indica a fonte dos microrganismos contaminadores, e é necessário recorrer à contagem de grupos específicos (psicrótrofos, termofílicos, esporulados, estreptococos, coliformes, etc.). De qualquer maneira, a Federação Internacional

de Laticínios (FIL-IDF) estabeleceu que uma contagem total superior a 10^5 ufc/mL indica que o leite foi obtido em condições higiênicas insatisfatórias, enquanto um valor inferior a esse indica que a higiene foi adequada durante a ordenha e as manipulações posteriores. Em alguns países, adotou-se a qualificação de Grau A ou Grau 1 para o leite cru que apresenta contagem total inferior a 10^5 ufc/mL; trata-se de uma norma muito rígida dificilmente atingida, pelo menos na Espanha e em outros países de clima quente. Contudo, esse é o objetivo que se propõe a União Européia. Com a introdução da refrigeração nas granjas, o transporte isotérmico até os centros regionais de coleta e às centrais e o armazenamento nas mesmas condições, também sob refrigeração, está se conseguindo reduzir a taxa microbiana a valores próximos àqueles.

Microbiota do interior do úbere

No interior do úbere, mesmo que o animal esteja saudável, sempre existem bactérias banais que contaminam o leite no momento da ordenha. Essa carga original é pequena, e consiste principalmente de micrococos e bactérias corineformes (30 a 90%) e de estreptococos (0 a 50%), mas também pode haver grande variedade de bactérias Gram positivas esporuladas ou não, e Gram negativas, embora em taxas que geralmente não ultrapassam 10%.

Se o animal estiver doente, os microrganismos podem atingir o interior do úbere por via endógena, como no caso de *Mycobacterium tuberculosis* e das brucelas, e se estiver com mastite, encontra-se no interior do úbere grande quantidade do agente etiológico responsável.

Contaminação externa do leite

Desde o momento que sai do úbere, o leite fica exposto a contaminações posteriores. A taxa original do leite procedente de um animal saudável (aproximadamente 10^3 ufc/mL) multiplica-se imediatamente, após chegar ao exterior por um fator 10 ou 100 mL se o leite é obtido com alguma higiene, e o número de bactérias pode ultrapassar o nível de 10^6 ufc/mL se não forem respeitadas as condições mínimas de higiene.

Uma das fontes mais importantes é constituída pelo exterior das tetas; se estiverem sujas de terra, de esterco, de material das camas, etc. (que podem ter carga microbiana de até 10^8 - 10^9 ufc/g) causam grande contaminação do leite, podendo produzir contagens superiores a 10^5 ufc/mL, mas quando são limpas e secas cuidadosamente antes da ordenha, a taxa de bactérias do leite reduz-se consideravelmente.

O ar, desde que os locais estejam limpos e evitem-se as correntes, contribui pouco para a contaminação do leite. Nessas condições, não costuma haver mais de uma centena de microrganismos (principalmente micrococos, esporos e bactérias corineformes) por litro de ar. Além disso, se a ordenha é mecânica, fica mais difícil aos microrganismos chegarem ao leite.

Se a ordenha é manual, a pessoa que a realiza pode proporcionar quantidade variável de microrganismos. Nesse caso, a maior importância reside no risco de patógenos que podem chegar ao leite procedentes do ordenhador.

As águas utilizadas para limpeza dos utensílios são outra fonte de contaminação do leite. Mesmo sendo potável, pode ocorrer contaminação da água em tanques de armazenamento insuficientemente protegidos de pássaros, insetos, pó, etc.

O tipo de microrganismo que provém dessas fontes é muito variável: esporos (solo, ar, camas, silo, etc.), coliformes (esterco, camas, água, etc.), estreptococos fecais (esterco, águas), micrococos (pêlos, ar), bactérias psicrotróficas (camas, forragem, água), bactérias lácticas (alimentos verdes), patógenos (do animal, da pessoa que ordenha), etc.

Equipamento de ordenha e outros utensílios

Quando se asseguram as condições higiênicas adequadas durante a ordenha, as ordenhadeiras, as tubulações, os tanques refrigerantes, as cântaras, etc., constituem as principais fontes de contaminação do leite nas instalações modernas. Pode haver milhões de bactérias nas paredes dos utensílios mal-lavados e mal enxutos. Os microrganismos mais comuns que provém desse material são bactérias lácticas e psicrotróficas, sendo comum a presença de coliformes em grandes

quantidades. Portanto, para evitar a contaminação geral do leite, é preciso fazer limpeza exaustiva de cântaras, máquinas, tubulações e tanques, e, inclusive, fazer uma verdadeira esterilização ou desinfecção destes (com vapor, ebulição controlada, aplicação de desinfetantes, etc.).

Um fator importante a considerar é a temperatura. Quando o leite sai do úbere, sua temperatura é muito favorável ao crescimento microbiano. É necessário criar rapidamente condições que inibam sua proliferação, o que em geral é feito mediante o resfriamento do leite. O ideal é que as granjas disponham de tanques refrigerados para reduzir rapidamente a temperatura do leite a valores inferiores à faixa de 5 a 8°C e mantê-la assim até o momento da coleta. Com isso, inibe-se eficazmente o desenvolvimento das bactérias lácticas e de outras de crescimento rápido, como os coliformes. Contudo, proliferam-se as psicrotróficas cujas repercussões serão estudadas mais adiante.

De qualquer modo, até o momento do transporte e durante ele, a taxa total de bactérias aumentará e virão outras bactérias procedentes das paredes das cisternas transportadoras. Se a temperatura em que se realiza o transporte não for muito baixa, multiplicam-se principalmente as bactérias lácticas, os coliformes e outras mesófilas, mas se for baixa (inferior a 8 até 10°C) proliferam as psicrotróficas.

COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE LEITE CRU

Após a ordenha, o leite é mantido na granja em cântaras ou em tanques refrigerados até ser transportado aos centros de coleta, às centrais leiteiras ou a outros centros de processamento do leite.

Nas regiões produtivas de clima temperado ou frio, o leite normalmente é coletado uma vez por dia, e costuma-se resfriá-lo com água à temperatura mais baixa possível, o que depende do método de resfriamento utilizado e da temperatura da água disponível. No verão, parte do leite obtido pode permanecer por tempo considerável a temperaturas elevadas, da ordem de 20 a 25°C, sendo aconselhável coletá-lo duas vezes ao dia para evitar crescimento abundante da microbiota mesófila. Um período de 6 horas pode ser suficiente para que a acidez aumente a níveis indesejáveis. Ao chegar ao seu destino, o leite é resfriado a temperaturas de até 5°C ou inferiores, e assim permanece armazenado até seu processamento; não deveria permanecer nessas condições mais do que 24 a 48 horas, mas isso nem sempre é possível.

Quando se coleta o leite a granel (de mistura), o normal deve ser refrigerá-lo imediatamente após a ordenha mediante um trocador de calor intercalado no circuito ou mediante

o emprego de tanques com refrigeração. A coleta do leite, que pode ser diária ou em dias alternados, é feita em caminhões equipados com cisternas isotérmicas que recolhem o leite produzido em diversas granjas. Por isso, há o risco de que um problema não detectado no leite procedente de uma das granjas possa alterar a totalidade de sua carga. Ao chegar a seu destino, o leite refrigerado na granja, quando não utilizado de imediato, é transferido para silos de armazenamento, alguns com capacidade de até 100.000 litros ou mais, onde é mantido refrigerado até seu tratamento térmico ou processamento. Dados adicionais sobre a coleta e o transporte do leite cru podem ser encontrados no RD 1679/94 (BOE 24/09/94).

O tipo de microbiota inicial, a taxa, a temperatura e o tempo de armazenamento são parâmetros que influem na proliferação das bactérias durante o armazenamento em estado cru. Por essa razão, só é possível fazer generalizações acerca das mudanças na microbiota durante o transporte e o armazenamento em centros de coleta e centrais. Contudo, a temperatura talvez seja um dos fatores mais importantes. Na temperatura de 25 a 30°C, a microbiota láctica e os coliformes são os microrganismos mais abundantes, mas, dado que a maioria das cepas e espécies dessas bactérias é mesófila, seu crescimento é eficazmente inibido ao se resfriar o leite, tanto mais quanto mais baixa for a temperatura, que não deveria ser superior à faixa de 4 a 5°C. Assim, a microbiota psicrotrofica encontra grande oportunidade de proliferar-se, e é essa microbiota que atingirá as maiores taxas. Nessa microbiota costumam prevalecer as bactérias aeróbias Gram negativas por serem as de crescimento mais rápido. Esses microrganismos não têm efeitos consideráveis uma vez que seu número não exceda valores da ordem de 10^7 ufc/mL; por isso, o leite pode apresentar aspecto normal durante vários dias, embora tenha sido elaboradas enzimas extracelulares que causam grandes problemas posteriormente (ver mais adiante).

De maneira geral pode-se dizer que em uma amostra de leite com taxa inicial de bactérias da ordem de 10^4 ufc/mL, que já na granja é resfriado a 4°C, e durante o transporte e o armazenamento não passa de 5 a 6°C (são condições excepcionais), depois de 3 a 4 dias sua taxa pode ter-se multiplicado por um fator 100, que ultrapassa o objetivo da UE. A microbiota será composta por bactérias psicrotroficas, e entre elas prevalecerão, quase sempre, as pseudomonas. Isso pode variar, visto que depende das espécies e da quantidade presente originalmente no leite. Dada a proliferação tão rápida dessas bactérias, permitiu-se a aplicação do tratamento térmico chamado de *termização* (63°C durante 15 segundos mediante trocadores de calor), a fim de manter o nível de bactérias psicrotroficas o mais baixo possível, minimizando, assim, os efeitos decorrentes da elaboração de enzimas extracelulares.

GRUPOS MICROBIANOS MAIS IMPORTANTES EM LATICÍNIOS E SUAS REPERCUSSÕES NO LEITE E EM PRODUTOS LÁCTEOS

Quando o leite chega à central leiteira, à queijaria, etc., sempre contém abundante e variada microbiota procedente das fontes estudadas anteriormente. Existem microrganismos termófilos, mesófilos e psicrotrofos; destes, a maioria é termolábil, mas alguns são termodúricos. Entre eles, alguns possuem β -galactosidase e/ou P- β -galactosidase, capazes, portanto, de metabolizar ativamente a lactose, o principal carboidrato do leite; alguns elaboram proteases, podendo atacar as proteínas do leite, e outros produzem lipase e, por isso, podem degradar a gordura; há outros que não se desenvolvem bem no leite, que se comporta como um simples veículo; há, ainda, os patógenos, que podem causar graves problemas ao consumidor.

O estudo detalhado de uma microbiota tão complexa pode ser orientado a partir de diferentes pontos de vista. A maioria dos tratados clássicos de laticínios leva em conta as características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, isto é, segue uma ordem taxonômica; um estudo dessa natureza não reflete a importância e as repercussões dos diferentes grupos no leite e nos produtos lácteos. O estudo também pode ser feito conforme os elementos que predominam nos diferentes produtos lácteos; é o que faz o livro de Robinson (1987). A análise dos microrganismos do leite e de seus produtos realizada dessa forma dá uma idéia muito clara dos microrganismos mais importantes em cada produto, mas talvez se preste a muitas repetições desnecessárias, dado que uma determinada bactéria pode exercer a mesma função em diferentes produtos lácteos; por exemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (de forma abreviada, *Lc. diacetylactis*) contribui para o sabor e o aroma da manteiga e de alguns tipos de queijos frescos. Por tudo isso, elaborou-se uma classificação funcional dos microrganismos mais importantes em laticínios, isto é, observando os efeitos que podem ter sobre o leite e os produtos lácteos. Foram classificados em: bactérias lácticas, bactérias esporuladas, bactérias psicrotroficas, bactérias de origem fecal, microrganismos patogênicos e miscelânea.

Bactérias lácticas

Podem ser classificadas como se observa na Tabela 2.1. A importância das bactérias lácticas deve ser examinada sob dois pontos de vista totalmente opostos, já que podem comportar-se como microrganismos deletérios ou benéficos. A ação deletéria deve-se ao fato de que metabolizam a lactose produzindo ácido láctico, que, ao acumular-se no leite, causa

Tabela 2.1 Principais bactérias lácticas de interesse em laticínios

1. HOMOFERMENTATIVAS	
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> : Queijos, alguns leites fermentados <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> : Queijos, alguns leites fermentados <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> : Queijos moles, manteiga, creme ácido, nata fermentada
<i>Streptococcus</i>	<i>St. thermophilus</i> : logurte, skyr, queijos duros de massa cozida
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> : logurte, nata fermentada, leite búlgaro, kourmis <i>Lb. lactis</i> : Queijos duros de massa cozida <i>Lb. helveticus</i> : Queijos duros de massa cozida <i>Lb. acidophilus</i> : Leite acidófilo, kourmis, probiótico <i>Lb. kefir</i> : Kefir
2. HETEROFERMENTATIVAS	
<i>Leuconostoc</i>	<i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> : Queijos, creme ácido, manteiga, nata fermentada <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> : Kefir
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i> : Kefir
3. HETEROFERMENTATIVAS FACULTATIVAS	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. casei</i> : Queijos semiduros e duros <i>Lb. plantarum</i> : Queijos semiduros e duros <i>Lb. kefir</i> : Kefir
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bf. bifidum</i> : Probiótico <i>Bf. longum</i> : Probiótico

redução do pH, e quando alcança um valor em torno de 4,6 (a temperatura ambiente) provoca precipitação das caseínas; com isso, produz-se alteração no leite. Normalmente, o leite cru é o produto mais afetado. No leite cru é necessário, portanto, deter a proliferação das bactérias lácticas, o que se consegue eficazmente mediante a refrigeração, já que são bactérias mesófilas ou termófilas, parando de proliferar ativamente abaixo de 8 a 10°C.

Todas as bactérias lácticas podem degradar a lactose e, portanto, ser responsáveis por essa ação deletéria. Contudo, as mais envolvidas costumam ser *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (de forma abreviada, *Lc. cremoris* e *Lc. lactis* por duas razões: porque se encontram

sempre em taxas muito altas e porque seus tempos de geração são mais curtos no pH usual (6,7 a 6,8) do leite fresco. Colaboram com elas outras bactérias, se estiverem presentes, não classificadas como lácticas, mas que metabolizam a lactose, principalmente coliformes e enterococos.

Os efeitos benéficos das bactérias lácticas residem principalmente em três ações:

- Atacam a lactose produzindo ácido láctico
- Participam das degradações protéicas que acontecem durante os processos de maturação
- Produzem diacetil acetaldeído, etc., a partir de citrato (*Lactococcus diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris*).

Todas as bactérias indicadas na Tabela 2.1 são de interesse na indústria láctea. Na mesma tabela mostra-se, de forma resumida, em que produtos são mais importantes.

Essas bactérias, isoladas originalmente de diversos produtos fabricados de forma artesanal, foram muito bem selecionadas, e atualmente fazem parte dos chamados cultivos iniciadores, cujo destino é a adição ao leite pasteurizado para a preparação dos diversos produtos lácteos apresentados na Tabela 2.1.

Bactérias esporuladas

Na microbiota do leite, pode haver formas esporuladas, principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Em laticínios a importância da presença de esporos no leite tem duas fontes: uma relacionada com os leites esterilizados e a outra com os queijos duros e semiduros.

O conceito de leite esterilizado, independentemente do método que se empregue para obtê-lo, implica chegar à estabilidade microbiológica, o que se consegue mediante tratamentos térmicos que pretendem a destruição de todos os microrganismos viáveis, incluídos os esporulados. Quando se deseja preparar um leite microbiologicamente estável, é necessário reduzir as formas bacterianas mais termorresistentes, os esporos, a níveis estatisticamente desprezíveis, o que só pode ser alcançado submetendo o leite a tratamento térmico com temperatura bastante superior a 100°C.

Durante muitos anos, a única forma de esterilizar um alimento era colocá-lo, não-estéril, em embalagens não-estéreis que, em seguida, eram lacradas e, posteriormente, submetidas, em autoclaves, à ação do calor. No caso particular do leite, observou-se que aplicar o conceito 12D, referente a *Clostridium botulinum* (ver Volume 1, Capítulo 8), não era suficiente para assegurar a estabilidade do leite do ponto de vista microbiológico. Isso porque havia outros esporos mais termorresistentes que as de *Cl. botulinum*, como é o caso dos de *Bacillus stearothermophilus*, ou porque outros com a mesma termorresistência que este eram encontrados normalmente em taxas muito maiores (*B. subtilis* e *B. cereus*), razão pela qual, dada a natureza logarítmica da destruição dos microrganismos pelo calor, não era possível conseguir a esterilidade comercial.

Embora esse problema tenha sido resolvido mediante a aplicação de tratamentos térmicos mais intensos, observou-se que, durante as esterilizações convencionais em autoclaves, ocorria uma série de reações que conferiam ao leite características sensoriais indesejadas (modificações da cor e do sabor como consequência das reações de escurecimento não-enzimático), ao mesmo tempo em que se perdia parte do valor nutritivo (desativação parcial de algumas vitaminas, perda de lisina, etc.). Por isso, desenvolveram-se

os processos de esterilização atuais, que são conhecidos como UHT (*ultra high temperature*). Devido à maior inclinação do gráfico de termodestruição dos esporos em relação ao gráfico da velocidade das reações químicas dependentes da temperatura (ver Capítulo 3), os tratamentos UHT apresentam maior eficácia esporicida e, ao mesmo tempo, são menos prejudiciais no que se refere às modificações das propriedades sensoriais e às perdas do valor nutritivo. As combinações tempo-temperatura utilizadas nos tratamentos esterilizantes do leite foram calculadas de acordo com a termorresistência dos esporos de *B. stearothermophilus* e *B. subtilis*.

Em relação aos queijos duros e semiduros, os esporos que adquirem maior importância são os de algumas espécies do gênero *Clostridium*. A pasteurização do leite não destrói as formas esporuladas e, por isso, se estiverem presentes nele, passarão ao queijo. Em determinadas condições, podem germinar e proliferar-se, gerando gás como um dos produtos resultantes de seu metabolismo. Esse gás é prejudicial ao queijo, provocando o inchamento que é conhecido como *inchamento tardio*. Essa alteração é particularmente importante nos queijos semiduros e duros. A espécie que em geral está envolvida é *Cl. tyrobutyricum* cujos esporos procedem do alimento armazenado.

Bactérias psicrotróficas

As bactérias psicrotróficas adquiriram grande importância a partir das observações, não muito antigas (década de 1970), de cientistas da Universidade de Lund, que revelaram a presença de proteases ativas no leite esterilizado, produzidas por pseudomonas que contaminavam o leite cru.

Os métodos atuais de coleta de leite nas granjas em tanques refrigerados (igual ou menor a 5°C), seu transporte às centrais leiteiras em cisternas isotérmicas (ou previamente a centros regionais de coleta onde é mantido em refrigeração até ser transportado à central) e sua manutenção nas centrais, também sob refrigeração, durante horas (às vezes mais de 24 horas) tornaram possível aumentar a vida útil do leite cru em alguns dias antes do tratamento térmico. Contudo, a aplicação de frio acarretou outros tipos de problemas graves decorrentes da oportunidade que se apresenta às bactérias psicrotróficas de proliferar-se, podendo atingir níveis tais que chegam a produzir por elas mesmas e, sobretudo, por suas enzimas extracelulares, efeitos indesejáveis.

As bactérias psicrotróficas encontradas no leite e nos produtos lácteos não constituem um grupo taxonômico específico. As cepas descritas pertencem aos dois grandes grupos de bactérias (Gram positivas e Gram negativas), e foram incluídas em pelo menos 15 gêneros. Nessa diversidade, normalmente predomina *Pseudomonas* spp., e quase invariavelmente

detectam-se *Flavobacterium* spp., *Acinetobacter* spp. e enterobactérias embora em proporções menores.

As bactérias psicrotóricas são francamente termolábeis, muito mais que as bactérias lácticas; por isso, sua taxa sempre se reduz a valores estatisticamente desprezíveis durante os tratamentos de pasteurização HTST. Contudo, as proteases e as lipases extracelulares produzidas por algumas cepas, particularmente pseudomonas (justamente as que predominam), são verdadeiramente termorresistentes, não sendo desativadas totalmente nem mesmo com os tratamentos térmicos utilizados na esterilização do leite mediante processos UHT. A termorresistência das lipases e das proteases das pseudomonas psicrotóricas é muito maior (mais de 100 vezes a temperaturas usuais no processo UHT) que a dos esporos mais termorresistentes (os de *B. stearothermophilus*).

A conseqüência da grande termoestabilidade das proteases e das lipases elaboradas pelas bactérias psicrotóricas é que elas podem continuar agindo nos produtos já elaborados se as condições de temperatura de armazenamento e pH do produto forem favoráveis, dando margem a degradações do material protéico e lipídico nos produtos (leite UHT queijo, manteiga, etc.) e derivados lácteos (batidas, sorvetes, etc.), que ficam armazenados durante longos períodos. O resultado dessas atividades enzimáticas manifesta-se pelas modificações das propriedades sensoriais desses produtos que podem ser recusados pelo consumidor.

As proteases atacam principalmente a β -caseína e a κ -caseína, resultando no aparecimento de sabores amargos e no aumento da viscosidade do leite. É difícil determinar o tempo de armazenamento do produto para que se verifiquem essas alterações, mas algumas experiências realizadas a respeito indicam que concentrações de bactérias psicrotóricas de cerca de 10^6 ufc/mL no leite cru elaboram quantidade de proteases capaz de dar margem ao aparecimento, no leite UHT, das alterações mencionadas, em períodos inferiores a 20 semanas.

O substrato das lipases é constituído por triglicérides do leite, que são o componente majoritário da gordura (em torno de 98% dela), cuja ligação éster é rompida com a conseqüente liberação de ácidos graxos. Quando há taxa excessiva de ácidos graxos livres de baixo peso molecular, particularmente ácido butírico, aparecem os sinais típicos da rancificação hidrolítica. Também é difícil estabelecer a taxa de bactérias psicrotóricas do leite cru e o tempo necessário para que apareçam os sinais de rancificação no leite UHT ou em outros produtos lácteos. Afirmou-se que, quando o leite cru apresenta uma carga de bactérias psicrotóricas não excessivamente alta (em torno de 10^5 ufc/mL), no leite UHT começa-se a perceber leve sabor de ranço entre 32 e 88 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Essas contagens e outras ainda maiores são comuns nos tanques de leite cru.

As repercussões da presença de bactérias psicrotóricas constituem, portanto, um problema para a indústria láctea atual, cuja solução exigirá inúmeras pesquisas, visto que até o momento não se conseguiu um método eficaz para combatê-lo. O único meio disponível para evitar a presença de bactérias psicrotóricas no leite cru, em proporções elevadas, baseia-se nos seguintes pontos: a) A obtenção do leite de forma higiênica. b) O resfriamento imediato (antes de 2 horas) do leite cru até 4°C ou menos. c) A manutenção dessa temperatura até o momento do tratamento na central, que deve ser realizado antes de 48 horas de sua chegada. d) Limpeza e esterilização efetivas dos equipamentos utilizados na produção, coleta e transporte do leite. Recentemente, como se comentou antes, foi autorizado o emprego da termização para manter a taxa de bactérias psicrotóricas o mais reduzida possível.

Bactérias de origem fecal

A presença de taxas elevadas de bactérias fecais no leite cru é um indicador de obtenção e de manipulação do leite em condições higiênicas deficientes. Os coliformes metabolizam a lactose, produzindo, entre outras substâncias, ácido láctico e dióxido de carbono. O primeiro, junto com o que é produzido pelas bactérias lácticas, provoca aumento da acidez do leite. Portanto, os coliformes colaboram com os lactococos na alteração do leite cru por acidificação. Combate-se esse efeito mediante a refrigeração do leite, com o que se inibe eficazmente o crescimento de todas essas bactérias. O CO₂ produzido pelos coliformes adquire importância nos queijos. Os coliformes proliferam-se ativamente nos primeiros dias de maturação, e o CO₂ produzido fica retido na massa do queijo, dando lugar à formação de grande número de pequenos buracos. Se o número de coliformes é excessivo, o gás gerado pode causar o inchamento do queijo; é o que se conhece com o nome de *inchamento precoce* dos queijos. Quando a maturação avança, o pH terá descido a valores suficientes para deter o desenvolvimento dos coliformes, de tal maneira que, depois de 2 a 3 meses de maturação, não se detectam mais coliformes (ou detectam-se em níveis muito baixos).

De outro ponto de vista, os coliformes são importantes porque algumas cepas são patogênicas, como *Escherichia coli* enteropatogênica, podendo representar perigo para a saúde.

O *inchamento precoce* dos queijos, com o risco que significa a presença de coliformes patogênicos no leite, é combatido mediante a pasteurização.

A importância da presença no leite de bactérias fecais não-fermentadoras da lactose, como as do gênero *Salmonella*, é o caráter patogênico de muitas espécies. Trata-se de

bactérias termolábeis que, portanto, são destruídas durante a pasteurização.

Quanto aos enterococos, o aspecto mais importante é seu caráter termodúrico; se estiverem presentes em taxas elevadas, muitos deles sobreviverão à pasteurização. Outra particularidade dos enterococos é o poder de multiplicar-se em amplo intervalo de temperaturas (entre menos de 10°C até mais de 45°C), e por isso, se sobreviverem à pasteurização, poderão participar dos processos de maturação de alguns tipos de queijos. A capacidade que têm de crescer em atividades de água mais baixas do que as bactérias lácteas coloca-as entre as bactérias predominantes nas últimas fases do processo de maturação de alguns queijos duros e semiduros, depois de 4 a 6 meses de maturação.

A possibilidade de sobreviver à pasteurização faz com que permaneçam viáveis no leite assim tratado. Fermentam a lactose por via homoláctica, do mesmo modo que as bactérias lácticas, mas não é provável que provoquem a alteração do leite pasteurizado se este for mantido sob refrigeração.

Microrganismos patogênicos

A OMS, em sua obra já clássica de 1966, *Higiene do leite*, apresentava uma lista de doenças transmissíveis ao homem por intermédio do leite. Nela incluíam-se virose, infecções por riquetsias, infecções bacterianas, protozoonose e helmintose. Não é preciso falar aqui do risco que significa para a saúde humana o consumo de leite não-pasteurizado (ou não-fervido) ou de queijos frescos elaborados com leite cru. Isso já é bem-conhecido. As legislações da maioria dos países não permitem, de maneira geral, o consumo de leite cru nem de queijos produzidos com leite não-pasteurizado com tempo de maturação inferior a dois meses.

Devido aos graves surtos de listeriose nos Estados Unidos, durante a década de 1980, por consumo de leite e de algum tipo de queijo fresco, talvez valha a pena, neste item, falar um pouco sobre a *Listeria monocytogenes*. Embora já se tenha sugerido há mais de meio século que a *L. monocytogenes* poderia ser transmitida pelos alimentos, os recentes surtos de listeriose voltaram a chamar a atenção para o papel dos alimentos na transmissão dessa doença. Alguns trabalhos recentes informam que a *L. monocytogenes* não é destruída pela pasteurização, enquanto outros concluem que as condições mínimas estabelecidas pela FDA para a pasteurização do leite (71,7°C, 15 segundos) destrói eficazmente a *L. monocytogenes*. Porém, a termorresistência dessa bactéria parece ser maior quando sua localização é intracelular, nos leucócitos polimorfonucleares. Outro ponto que merece ser destacado é que, aparentemente, no leite pasteurizado mantido sob refrigeração por tempo mais ou menos prolongado,

voltam a detectar-se algumas listérias, talvez devido a uma revitalização das bactérias lesadas, não-mortas, ou a uma revitalização e ao crescimento posterior ou simplesmente ao crescimento de um número muito reduzido de bactérias sobreviventes (não se pode esquecer a natureza logarítmica da morte microbiana pelo calor). O que está claro é que a *L. monocytogenes* cresce a temperaturas de refrigeração.

De qualquer maneira, é preciso ser muito prudente ao utilizar os resultados experimentais para reduzir a periculosidade que representa a presença de *L. monocytogenes* nos alimentos, por várias razões: 1) Nas experiências de laboratório costumam-se utilizar taxas muito elevadas de bactérias, da ordem de 10⁶ a 10⁸/mL, que não refletem a contaminação real do leite cru. Nesse sentido, informou-se que o leite procedente de vacas com mastite por *L. monocytogenes* pode conter entre 18.000 e 400.000 células somáticas por mL, mas, em leite de mistura, essa bactéria está presente em taxas muito reduzidas, em torno de poucas bactérias por mL 2) Não se conhece ainda a dose infecciosa para seres humanos, mas estima-se em 100 a 1.000 unidades. 3) Não se sabe em que extensão se transmite *L. monocytogenes* pelos alimentos, pois, sem dúvida, existem outras formas de transmissão.

Para concluir, pode-se dizer que devido à ubiqüidade de *L. monocytogenes* na natureza (onde se incluem os alimentos) e à baixa incidência da doença no homem (embora quando se apresente seja grave), mesmo em pessoas de alto risco (mulheres gestantes, indivíduos imunodeprimidos, etc.), ainda resta muito a ser descoberto acerca das ocorrências que levam a uma infecção grave.

Seja como for, vale reiterar que a FDA dos Estados Unidos assegura que os tratamentos pasteurizadores aplicados naquele país são suficientes para destruir a bactéria e, no caso da Espanha, é permitido ultrapassar 72°C, com o que a possibilidade de sobrevivência de *L. monocytogenes* é praticamente nula (ver também o item "Definições" no Capítulo 3).

Miscelânea

Nesse grupo, inclui-se uma série de microrganismos, não relacionados entre os anteriores, que participam da maturação de alguns tipos de queijos ou nos processos fermentativos de determinados produtos lácteos.

Brevibacterium linnens é uma bactéria pigmentada, de cor vermelho-alaranjada, que se instala na superfície de certos tipos de queijos (Limburger, Saint Paulin, etc.), sendo responsável pela cor e untuosidade da casca. Além disso, participa da degradação protéica que ocorre durante a maturação desses queijos.

Propionibacterium freudenreichii, var. *shermanii* é a bactéria responsável pela fermentação propiônica dos queijos gruyère.