



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

RONALDO TAMANINI

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS COM ATIVIDADE
ANTAGONISTA A *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM
LEITE CRU PRODUZIDO NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Londrina
2008

RONALDO TAMANINI

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS COM ATIVIDADE ANTAGONISTA A
Listeria monocytogenes E *Escherichia coli* EM LEITE CRU PRODUZIDO
NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Sanidade Animal
Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T153b Tamanini, Ronaldo.

Bactérias ácido lácticas com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em leite cru produzido no Estado de Pernambuco / Ronaldo Tamanini. – Londrina, 2008.
64f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Leite – Bacteriologia – Teses. 2. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 3. *Escherichia coli* – Teses. 4. *Listeria* – Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 641:579

RONALDO TAMANINI

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS COM ATIVIDADE ANTAGONISTA A
Listeria monocytogenes E *Escherichia coli* EM LEITE CRU PRODUZIDO
NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Vanerli Beloti

Orientadora

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Luís Augusto Nero

Depto. de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Ernst Ekehardt Müller

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Pedro e Creuza, que me abriram as portas do mundo e por terem dado a oportunidade para que eu chegasse até aqui

A Kellinha, meu grande Amor, companheira de todos os momentos, obrigado pela força, compreensão, cumplicidade, ajuda nos momentos mais difíceis e por toda a paciência do mundo.

A Neli pela orientação, profissionalismo, confiança, carinho e amizade. Obrigado pelo conhecimento adquirido ao longo destes anos

A Márcia por ter acreditado em mim e aberto as portas do LIPOA. Muito obrigado pelo carinho, pela amizade e pelo conhecimento transmitido.

Ao Douglas, Ana Paula, Henrique, Alexandre, Lívia, Rafael, Marcelo, Loredana, pela ajuda durante a realização desta pesquisa. Obrigado pelo convívio, companheirismo conversas, risadas, discussões, *happy-hous*, churrascos e pelas faxinas e reformas no LIPOA. Obrigado por me agüentar

Aos estagiários do LIPOA, pela ajuda e por terem a paciência de me aturar.

Ao Nero pelo conhecimento e por ter deixado as BAL de herança para mim.

A todos que compartilharam as milhagens por Pernambuco, as estradas ruins, as noites mal dormidas, os trabalhos na madrugada, a distancia de casa e os camarões. Sobrevivemos.

A Edleide e os funcionários do LEAAL da Universidade Federal de Pernambuco pela colaboração nessa pesquisa.

A todos os amigos, professores, colegas de pós-graduação, funcionários do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva.

TAMANINI, R. **Bactérias ácido láticas com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em leite cru produzido no estado de Pernambuco.** 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008

RESUMO

As Bactérias Ácido Láticas (BAL) são microrganismos naturalmente encontrados em vários alimentos e possuem importância no controle de microrganismos patogênicos em alimentos, pois produzem uma série de substâncias com potencial antimicrobiano, que afetam microrganismos, como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Com o objetivo de verificar a presença de *L. monocytogenes*, enumerar *E. coli*, estimar as contagens de BAL, e verificar a atividade antagonista das BAL isoladas em relação a *L. monocytogenes* e *E. coli* foram coletadas amostras de leite cru de 45 propriedades leiteiras da região agreste de Pernambuco. Para detecção de *L. monocytogenes* foi utilizado o sistema VIDAS Listeria (bioMerieux) e para enumeração de *E. coli* foi utilizado Petrifilm™ EC (3M) com incubação a 35°C por 48 horas. Para contagem de BAL as amostras foram diluídas em caldo MRS e semeadas em placas de Petrifilm™ AC (3M), com incubação a 30°C por 72 horas em microaerofilia. O antagonismo aos patógenos foi determinado através da metodologia *spot-on-the-lawn* modificada, utilizando a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 25922. Para isso foram selecionadas 671 culturas de BAL isoladas das 45 amostras. Em nenhuma amostra de leite foi detectada a presença de *L. monocytogenes* e contagens de *E. coli* variaram de $< 1,0 \times 10^3$ UFC/mL a $1,3 \times 10^5$ UFC/mL. As contagens de BAL variaram de $11,1 \times 10^4$ UFC/mL a $9,9 \times 10^6$ UFC/mL. Das culturas testadas com relação à capacidade antagonista a *L. monocytogenes*, 549 (81,8%) apresentaram atividade antagonista, sendo que 410 (61,2%) com inibição total e 139 (20,7%) com inibição parcial. Quanto a *E. coli*, 258 (38,5) culturas apresentaram atividade antagonista, sendo todas com inibição parcial. As altas contagens de *E. coli* encontradas constituem um risco para a saúde e indicam possível contaminação por outros enteropatógenos. A alta frequência de BAL com capacidade antagonista a *L. monocytogenes*, pode ser responsável pela ausência deste patógeno nas amostras de leite estudadas.

Palavras-chave: leite, bactérias láticas. *Listeria monocytogenes*. *Escherichia coli*. Antagonismo.

TAMANINI, R. **Lactic Acid bacteria whit activity antagonic to *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on raw milk produced in the Pernambuco state.** 2008. 64 f. Dissertation (Animal Science Master Degree) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are microorganisms naturally found in several foods that have an important role in controlling pathogenic microorganisms in food since they are able to produce numerous substances with antimicrobial antagonic potential, that affect microorganisms such a *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Aiming to verify the presence of *L. monocytogenes*, enumerate *E. coli* and LAB, and verify the antagonic activity of isolated LAB against *L. monocytogenes* and *E. coli*, samples of raw milk were collected from 45 milk farms from Agreste region of Pernambuco. For *L. monocytogenes* detection VIDAS Listeria (bioMeriex) system was use and for *E. coli* enumeration Petrifilm™ EC (3M) was use and incubated at 35°C for 48 hours. For LAB counting samples were diluted in MRS broth and distributed Petrifilm™ AC (3M) plates, incubated for 72 hours on microaerophilic conditions. Pathogens antagonism was determined through *spot-on-the-lawn* modified methodology using *L. monocytogenes* ATCC 7644 and *E. coli* ATCC 25922 strains. In order to do that 671 LAB cultures isolated from the 45 samples were selected. *L. monocytogenes* was not detected in any milk sample and *E. coli* counting varied from $< 1, 0 \times 10^3$ to $1,3 \times 10^5$ CFU/mL. LAB counting varied from $11,1 \times 10^4$ to $9,9 \times 10^6$ CFU/mL. Cultures tested for antagonic capacity against *L. monocytogenes*, were antagonic in 549 (81,8%) samples, from which 410 (61,2%) showed total inhibition and 139 (20,7%) partial inhibition. Concerning *E. coli*, 258 (38.5) cultures showed antagonist activity, all with partial inhibition. High countings of *E. coli* found constitute a risk to health and indicate potential contamination by other enteropathogens. Elevated frequency of LAB antagonic to *L. monocytogenes* can be responsible for the absence of this pathogen in milk samples studied.

Keywords: Milk. Lactic bacteria. *Listeria monocytogenes*. *Escherichia coli*. Antagonism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das amostras de leite cru, provenientes da região agreste de Pernambuco, de acordo com os resultados de contagens de coliformes totais, *Escherichia coli* e bactérias ácido lácticas e análise estatística..... 56

Tabela 2. Frequência de Bactérias Ácido Lácticas com antagonismo total, parcial e não antagonistas a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* isoladas de 45 amostras de leite cru. provenientes da região agreste de Pernambuco..... 58

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Classificação mundial dos principais produtores de leite - 2006 14
- Quadro 2.** Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados 2005..... 15
- Quadro 3.** Classificação dos principais Estados produtores de leite no Brasil – 2006..... 16
- Quadro 4.** Produtividade de leite por vaca nos Estados brasileiros, 2005..... 17
- Quadro 5.** Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade nas regiões do Estado de Pernambuco, 2005..... 18
- Quadro 6.** Classificação dos principais municípios produtores de leite da região Agreste de Pernambuco - 2005..... 19
- Quadro 7.** Leite produzido e inspecionado no Brasil (2000-2005), estimando-se a provável parcela destinada ao comércio informal, em milhões de litros21

LISTA DE FIGURAS

Estado da Arte

Figura 1. Regiões geográficas do Estado de Pernambuco, Brasil. A: Região Metropolitana de Recife, B: Zona da Mata, C: Agreste, D: Sertão, E: São Francisco..... 18

Figura 2. Mapa mostrando os oito maiores produtores de leite municípios da região Agreste de Pernambuco. 1. São Bento do Una; 2. Pedra; 3. Itaíba; 4. Buíque; 5. Pesqueira; 6. Cachoeirinha; 7. Águas Belas; 8. Bom Conselho.....20

Artigo para publicação: Bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru com atividade antagonis

a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

Figura 1. Halo de inibição (HI) do crescimento de *Listeria monocytogenes* provocado por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru. 57

SUMÁRIO

ESTADO DA ARTE	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. PRODUÇÃO DE LEITE	14
3. MICRORGANISMOS VEICULADOS PELO LEITE	22
3.1. Microrganismos indicadores	22
3.1.1. Aeróbios mesófilos	22
3.1.2. Coliformes	23
3.1.2.1. Coliformes totais	23
3.1.2.2. Coliformes termotolerantes	24
3.2. Microrganismos patogênicos	24
3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	24
3.2.2. <i>Escherichia coli</i>	27
3.3. Bactérias ácido lácticas	29
4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PRODUZIDO NO SIL	32

5. REFERÊNCIAS	36
OBJETIVOS	43
Objetivo geral	43
Objetivos específicos	43
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE CRU COM ATIVIDADE ANTAGONISTA A <i>Listeria monocytogenes</i> E <i>Escherichia coli</i>	44
RESUMO	45
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1. Área de estudo	49
2.2. Análises microbiológicas	49
2.2.1. Diluições	49
2.2.2. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	50
2.2.3. Enumeração de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	50
2.2.4. Estimativa da contagem de bactérias ácido láticas	51
2.2.5. Estoque e recuperação das culturas	51
2.2.5.1. Estoque e recuperação das BAL	51

2.2.5.2. Estoque e recuperação dos patógenos	52
2.2.6. Verificação do antagonismo	52
2.3. Análise estatística	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4. CONCLUSÃO	60
5. REFERÊNCIAS	61

ESTADO DA ARTE

1. INTRODUÇÃO

O leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Do ponto de vista nutricional, o leite é considerado um dos alimentos mais completos, por apresentar em sua composição alto teor de proteínas, vitaminas, sais minerais, além de ser importante fonte de cálcio, sendo amplamente comercializado e consumido pela população, e recomendado especialmente para crianças e idosos (LUQUET, 1991).

Devido a quantidade e qualidade de seus nutrientes é um excelente meio de cultura para microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 2007), e pode representar uma importante fonte de transmissão das Enfermidades de Origem Alimentar, caso seja consumido cru, sem processamento térmico adequado (BOOR, 1997). Diversos microrganismos patogênicos podem ocorrer naturalmente no leite cru, como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (CHAMBERS, 2002; RIEDEL, 1992). Além dos patogênicos, a microbiota autóctone do leite cru é formada por microrganismos deteriorantes que podem causar alterações químicas, tais como a degradação de gorduras, de proteínas e de carboidratos, tornando-o impróprio para o consumo e industrialização (COUSIN, 1982).

2. PRODUÇÃO DE LEITE

A produção mundial de leite em 2006 atingiu 645 bilhões de litros. No cenário mundial, o Brasil é o sexto produtor mundial de leite fluido, com aproximadamente 25,4 bilhões de litros produzidos em 2006. O maior produtor mundial é a Índia, seguido pelos Estados Unidos e pela China (Quadro1).

<i>Países</i>	<i>Produção de leite Milhões de toneladas (%)</i>
1. Índia	92 (14,3)
2. Estados Unidos	82 (12,7)
3. China	32 (5,0)
4. Rússia	30 (4,7)
5. Alemanha	28 (4,3)
6. Brasil	25 (3,9)
7. França	24 (3,7)
8. Nova Zelândia	15 (2,3)
9. Ucrânia	13 (2,0)
Total	645 (100,0)

Quadro 1: Classificação mundial dos principais produtores de leite - 2006

Fonte: FAO (2008)

A produção leiteira brasileira é alta devido ao número de animais ordenhados, mas a sua produtividade é baixa quando comparada a de outros países (Quadro 2). A baixa produtividade se deve a vários fatores como deficiências no controle de sanidade animal, manejo inadequado, nutrição deficiente, pouca ou nenhuma seleção genética (FONSECA; SANTOS, 2002; PRATA, 2001).

<i>Países</i>	<i>Produção de leite (mil toneladas)</i>	<i>Vacas ordenhadas (mil cabeças)</i>	<i>Produtividade (quilo/vaca/ano)</i>
Japão	8.285	910	9.104
Estados Unidos	80.282	9.041	8.880
Canadá	7.797	1.066	7.314
União Européia	132.027	23.533	5.610
Austrália	10.429	2.041	5.110
Argentina	9.850	2.100	4.690
China	28.000	6.700	4.179
Nova Zelândia	14.500	3.970	3.652
Ucrânia	13.800	3.950	3.494
Rússia	32.000	10.400	3.077
Brasil	24.025	15.100	1.591
México	9.855	6.850	1.439
Índia	38.500	38.000	1.013

Quadro 2: Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados, 2005.

Fonte: USDA (2008)

O agronegócio do leite no Brasil caracteriza-se como um dos mais importantes, tanto sob ótica social, quanto econômica. Esta atividade está presente em todo território nacional, e desempenha papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de emprego e renda para a população. A Quadro 3 apresenta os principais Estados Brasileiros produtores de leite em 2006, ultimo dado estatístico disponível no Brasil. Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional, com 27,9% do total produzido. A produção leiteira do Paraná colocou o Estado como segundo maior produtor nacional, com 10,6% do total produzido, superando os Estados do Rio Grande do Sul(terceiro colocado com 10,3%), Goiás (quarto colocado com 10,3%) e São Paulo (quinto colocado com 6,87%). Já o Estado de Pernambuco ocupou a 10ª posição no “ranking” nacional, e é o 2º maior produtor da região Nordeste.

<i>Estado</i>	<i>Produção de leite milhões de litros (%)</i>
1. Minas Gerais	7.094,1 (27,9)
2. Paraná	2.703,6 (10,6)
3. Rio G. do Sul	2.625,1 (10,3)
4. Goiás	2.613,6 (10,3)
5. São Paulo	1.744,0 (6,9)
6. Santa Catarina	1.709,8 (6,7)
7. Bahia	905,8 (3,6)
8. Pará	691,1 (2,7)
9. Rondônia	637,4 (2,5)
10. Pernambuco	630,3 (2,5)
Outros	4.043,4 (15,9)
Total	25.398,2 (100,0)

Quadro 3: Classificação dos principais Estados produtores de leite no Brasil – 2006

Fonte: IBGE (2008)

Apesar de ser o maior produtor, o Estado de Minas Gerais é apenas o quinto em produtividade. Neste aspecto, Santa Catarina é o que apresenta melhor desempenho. Pernambuco possui a sétima maior produtividade nacional e a segunda maior da região Nordeste (Quadro 4).

<i>Estados</i>	<i>Produtividade (litros/vaca/ano)</i>
1. Santa Catarina	2.153
2. Rio Grande do Sul	2.050
3. Paraná	1.842
4. Alagoas	1.493
5. Minas Gerais	1.482
6. Distrito Federal	1.412
7. Pernambuco	1.295
8. Rio de Janeiro	1.186
9. Mato Grosso	1.136
10. Goiás	1.134

Quadro 4: Produtividade de leite por vaca nos Estados brasileiros, 2005.

Fonte: Embrapa (2008)

Em 2006 a produção leiteira em Pernambuco foi de 630,3 milhões de litros, apresentando crescimento de 19,7% em relação à 2005 (IBGE, 2008). Atualmente, cerca de 14 mil pequenos e médios produtores estão na atividade leiteira, concentrados principalmente na região do Agreste (Quadro 5), e geram uma produção diária de 980 mil litros (IBGE, 2008; SPRRA, 2006; CONAB, 2004). Para impulsionar a cadeia produtiva do leite, no final do ano 2000 foi criado o Programa Social Leite de Pernambuco, que é uma parceria entre o Governo do Estado de Pernambuco e o Governo Federal, através do programa Fome Zero, com o principal objetivo de fornecer leite a famílias carentes, especialmente crianças, gestantes e lactantes. O programa compra o leite de pequenos produtores e distribui diariamente um litro de leite para mais de 80 mil famílias carentes de 147 cidades pernambucanas (SPRRA, 2006).

<i>Região</i>	<i>Produção mil litros (%)</i>	<i>Vacas ordenhadas (mil cabeças)</i>	<i>Produtividade (litros/vaca/ano)</i>
1. Agreste	393.778 (74,8)	240.528	1.637
2. Sertão	84.709 (16,1)	106.648	794
3. Mata	22.644 (4,3)	20.481	1.105
4. São Francisco	19.741 (3,8)	30.775	641
5. Metrop.de Recife	5.644 (1,1)	7.883	715
Total	526.516 (100,0)	406.315	1.295

Quadro 5: Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade nas regiões do Estado de Pernambuco, 2005.

Fonte: Embrapa (2008)



Figura 1. Regiões geográficas do Estado de Pernambuco, Brasil. A: Região Metropolitana de Recife, B: Zona da Mata, C: Agreste, D: Sertão, E: São Francisco.

Agreste de Pernambuco é a região intermediária entre a Zona da Mata e o Sertão (Figura 1) e é caracterizada por uma economia diversificada, com o cultivo de lavouras como milho, feijão e mandioca (entre outras), além da pecuária de leite e de corte (CONAB, 2006). Dados recentes revelam que nos últimos dois anos a produção leiteira dessa região cresceu 23%, com uma produção de 393.778 mil litros em 2006, o que representa 74,8 % da produção do Estado (IBGE, 2008; FIGUEIROA, 2006). Esta região também apresentou o maior índice de produtividade leiteira no Estado (1.637 litros/vaca/ano), conforme dados da Embrapa Gado

de Leite, em 2005 (EMBRAPA, 2008). O município de São Bento do Una é o maior produtor, seguido por Pedra e Itaíba (Quadro 6; Figura 2)

<i>Municípios</i>	<i>Produção de leite mil litros (%)</i>
1. São Bento do Una	43.800 (11,1)
2. Pedra	38.880 (9,9)
3. Itaíba	37.026 (9,4)
4. Buíque	32.130 (8,2)
5. Pesqueira	21.050 (5,4)
6. Cachoeirinha	17.280 (4,9)
7. Águas Belas	14.623 (3,7)
8. Bom Conselho	14.399 (3,7)
9. Venturosa	12.528 (3,2)
10. Sanharó	12.045 (3,1)
11. Garanhuns	10.905 (2,8)
40. Saloá	1.519 (0,4)
Total	393.778 (100,0)

Quadro 6: Classificação dos principais municípios produtores de leite da região Agreste de Pernambuco - 2005
Fonte: Embrapa (2008)

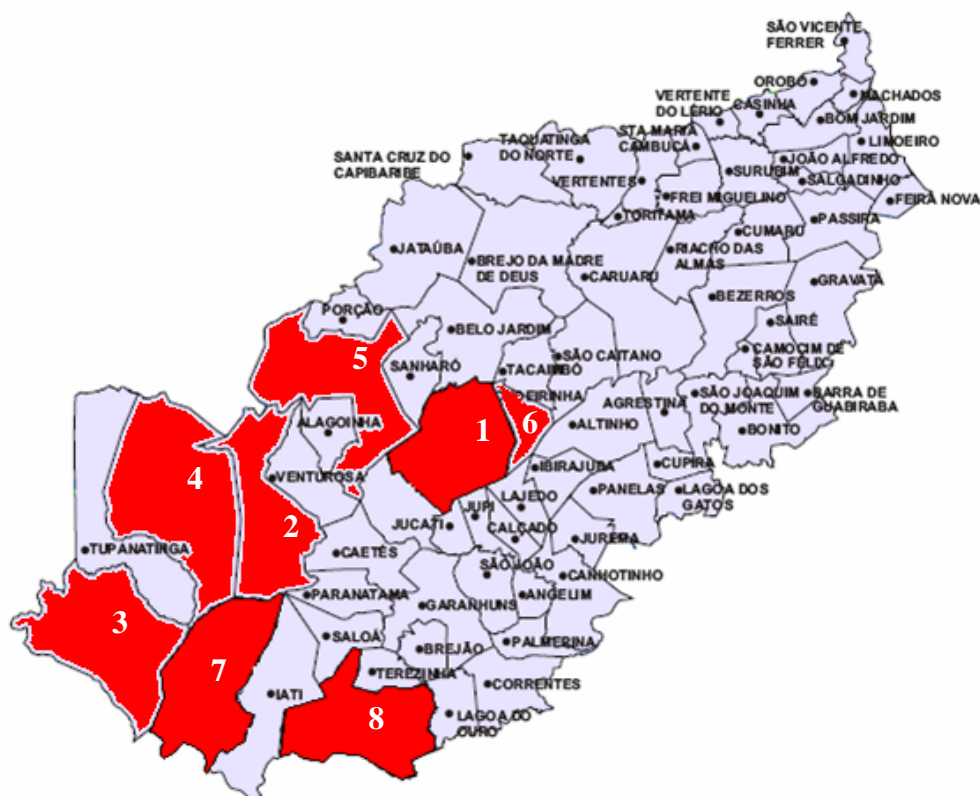


Figura 2: Mapa mostrando os oito maiores produtores de leite municípios da região Agreste de Pernambuco. 1. São Bento do Una; 2. Pedra; 3. Itaíba; 4. Buíque; 5. Pesqueira; 6. Cachoeirinha; 7. Águas Belas; 8. Bom Conselho.

Em 2005, estimou-se que 49,25% de toda a produção leiteira não passou por nenhum tipo de inspeção oficial (Quadro 7), e o mercado informal foi o seu provável destino, mesmo sendo proibido por lei desde 1952 (Brasil, 1952). O consumo de leite cru pode representar uma importante fonte de transmissão das Enfermidades de Origem Alimentar. Além de ser consumido, esse leite é freqüentemente empregado na fabricação de diversos tipos de derivados, principalmente queijos, o que transforma esses produtos também em alimentos de alto risco (ORRISS, 1997).

<i>Ano</i>	<i>Produção total</i>	<i>Produção Inspeccionada</i>	<i>Déficit (%)</i>
2000	20.380	12.105	8.275 (40,6)
2001	21.146	13.213	7.933 (37,5)
2002	22.315	13.221	9.094 (40,8)
2003	23.315	12.296	11.019 (47,3)
2004	23.320	11.710	11.610 (49,8)
2005*	23.320	11.840	11.480 (49,2)
Média	22.299	12.398	9.902 (44,4)

Quadro 7: Leite produzido e inspeccionado no Brasil (2000-2005), estimando-se a provável parcela destinada ao comércio informal, em milhões de litros.

* Produção referente ao período de janeiro a outubro de 2005

Fonte: IBGE (2008)

3. MICRORGANISMOS VEICULADOS PELO LEITE

3.1 Microrganismos indicadores

O controle microbiológico do leite é realizado, principalmente, através da pesquisa de microrganismos indicadores que podem fornecer informações sobre as condições sanitárias da produção, processamento e armazenamento, assim como a possível presença de patógenos e estimativa da vida de prateleira do produto. Os principais grupos de microrganismos indicadores de qualidade do leite são os aeróbios mesófilos e os coliformes (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

3.1.1 Aeróbios mesófilos

Aeróbios mesófilos (AM) são todos aqueles microrganismos capazes de se desenvolverem em temperaturas de 35-37°C em condições de aerobiose. Esses microrganismos indicam a qualidade com que o alimento foi obtido ou processado, e sua presença em altas contagens é indicativa de procedimento higiênico inadequado na produção, beneficiamento e/ou conservação, dependendo da origem da amostra. Também deve-se considerar que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, e assim, uma alta contagem de AM pode significar que houve condições para desenvolvimento de patógenos. Contagens elevadas de AM usualmente estão relacionadas à baixa qualidade e reduzida vida de prateleira do alimento e indicam insalubridade, mesmo que patógenos estejam ausentes. (FRANCO; LANGRAF, 2007).

A Instrução Normativa 51 (Brasil, 2002) estabelece que a contagem de AM para leite cru não ultrapasse 10^6 UFC/mL, a partir de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste e a

partir de 2007 nas regiões Norte e Nordeste. Para a Federação Internacional de Laticínios (FIL), contagens de até 2×10^4 UFC/mL para leite cru, significam condições ideais de produção, e acima de 10^5 UFC/mL significam condições inadequadas de obtenção. (CHAMBERS,2002). A IN 51, que é um plano de melhoria de qualidade no Brasil, estabelece que as contagens de AM não deverão ultrapassar 10^5 após julho de 2011 nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste e a partir de julho 2012 nas regiões Norte e Nordeste

3.1.2 Coliformes

3.1.2.1 Coliformes totais

O grupo dos coliformes totais, ou coliformes a 30°C, são microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* representados pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, que apresentam a capacidade de fermentar lactose produzindo ácido e gás quando incubadas a 35-37° C (FRANCO; LANDGRAF, 2007). O grupo coliforme inclui espécies dentre as quais encontram-se tanto bactérias originadas do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, como também os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, que possuem cepas de origem não-fecal (FORSYTHE, 2002). Estes microrganismos indicam o nível de contaminação ambiental que o alimento agregou (FRANCO; LANDGRAF, 2007). Em leite cru indicam em que condições higiênicas o leite foi obtido, sendo que contagens acima de a 100 UFC/mL são indicativos de condições higiênicas insatisfatórias de produção (CHAMBERS, 2002) São sensíveis à temperatura de pasteurização e sua presença em leite tratado termicamente indica processamento inadequado ou recontaminação após processamento (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

3.1.2.2 Coliformes termotolerantes

Coliformes termotolerantes (CTT), ou coliformes a 45°C, correspondem aos coliformes totais que continuam fermentando a lactose com produção de gás quando incubados a 45°C. Aproximadamente 90% dos CTT são cepas de *E. coli*. A presença de CTT tem significado importante, uma vez que existem linhagens patogênicas para homens e animais. Ainda indicam contaminação de origem fecal, assim como eventual ocorrência de outros enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

3.2 Microrganismos patogênicos

3.2.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri* (BELL; KYRIAKIDES, 1998). Todas as espécies de *Listeria* são amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas do solo, vegetação, esgoto, água, alimentação animal, carnes frescas e congeladas e fezes de animais saudáveis incluindo o homem (MCLAUHLIN et al., 2004).

Listeria monocytogenes, agente causador da listeriose, foi reconhecido como patógeno animal em 1924, em Cambridge, por Murray (MCLAUHLIN et al., 2004; MENA et al., 2004), mas apenas em 1980, com o aumento da ocorrência desta doença, que pode ser fatal, o interesse por esse microrganismo aumentou (MCLAUHLIN et al., 2004).

Trata-se de um bacilo Gram positivo, aeróbico, intracelular e anaeróbico facultativo, amplamente distribuído no meio ambiente e agente etiológico da listeriose humana e de animais (FRANCO; LANDGRAF, 2007). Apresenta características psicrotróficas, e pode

desenvolver-se e multiplicar-se em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração (DYKES, 2003). Essa bactéria também é capaz de sobreviver e multiplicar-se em alimentos com embalagens a vácuo, em atmosfera modificada e em ambientes com pouca atividade de água, medidas comumente utilizadas como técnicas de conservação (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004). Ainda apresenta grande resistência a agentes antimicrobianos e substâncias químicas, além de ser capaz de formar biofilmes sobre várias superfícies, o que torna difícil sua eliminação (TAKHISTOV; GEORGE, 2004).

Dentre os alimentos que veiculam este microrganismo destacam-se carnes cruas ou congeladas, leite e derivados, produtos marinhos, frutas e outros vegetais (LIN; CHOU, 2004; OKUTAMI et al., 2004). Sua transmissão está associada principalmente a alimentos prontos para o consumo, que são estocados em temperaturas de refrigeração por um longo tempo (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A infecção com *L. monocytogenes* pode causar doença sistêmica severa, febre e presença ou não de sintomas relacionados com o trato gastrointestinal. Em adultos a listeriose pode ocorrer na forma invasiva ou não invasiva. Os sintomas iniciais são parecidos com os da gripe (febre, fadiga, mal-estar, náusea, cólicas, vômitos e diarreia) e a listeriose invasiva em adultos é caracterizada por septicemia e meningite (WALLS; BUCHANAN, 2005). Mulheres grávidas acometidas por listeriose podem apresentar no feto infecção sistêmica grave, e na forma invasiva pode ocorrer aborto espontâneo. Em adultos e jovens, a doença se apresenta principalmente como septicemia ou infecção do sistema nervoso central (MCLAUHLIN et al. 2004). Além das gestantes, também são mais susceptíveis à infecção recém-nascidos, idosos e pessoas com o sistema imune comprometido (WALLS; BUCHANAN, 2005).

A maioria dos casos de listeriose em adultos e jovens ocorre entre imunossuprimidos, pacientes submetidos à terapia com esteróides ou citotóxicos ou ainda com neoplasias malignas. Outro grupo de risco inclui pacientes com AIDS, diabéticos, indivíduos com

comprometimento das válvulas do coração, alcoólatras e acometidos por cirrose. Listeriose cutânea e ocular podem ocorrer, especialmente depois do contato com o animal ou material infectado, podendo resultar em séria infecção sistêmica (MCLAUCHLIN et al., 2004).

O período de incubação da listeriose varia de um dia a algumas semanas, sendo a dose infectante de *L. monocytogenes* desconhecida (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

Pesquisas realizadas no Brasil e em outros países indicam que a frequência de isolamento da *L. monocytogenes* em leite cru é bastante variável

Estudo realizado por Nero et al. (2004a) em 210 amostras de leite cru produzidas em quatro regiões do Brasil, sendo 50 amostras da região de Pelotas (RS), 60 da região de Londrina (PR), 50 da região de Botucatu (SP) e 50 da região de Viçosa (MG), não detectou *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras.

Arcuri et al. (2006) não encontraram *L. monocytogenes* em pesquisa realizada em 14 rebanhos situados nas regiões sudeste de Minas Gerais e norte do Rio de Janeiro.

Padilha et al. (2001) também não encontraram este mesmo patógeno em 50 amostras de leite cru na região metropolitana de Recife-PE.

Em pesquisa realizada por Catão e Seballos (2001) em 45 amostras de leite cru dos municípios de Souza (15) e Campina Grande (15) no Estado da Paraíba e Garanhuns (15) no Estado de Pernambuco, *Listeria* spp. foi detectada em 33 (73,3%), sendo que em 17 (37,9%) havia a presença de *L. monocytogenes*. No município de Souza-PB *L. monocytogenes* foi detectada em 4 (26,7) amostras, em Campina Grande em 5 (33,3%) e em Garanhuns em 8 (53%) amostras.

Em estudo realizado na Turquia, Aygun e Pehlivanlar (2006) não detectaram *L. monocytogenes* em nenhuma das 47 amostras estudadas, tendo encontrado *L. ivanovii* e *L. grayi* em apenas 1 (2,2%) amostra.

Na Índia, *L. monocytogenes* também não foi encontrada em nenhuma das 35 amostras de leite cru analisadas, tendo sido encontrada *L. innocua* em 1 amostra (DHANASHREE et al., 2003). Em outro estudo neste país, 2060 amostras de leite foram submetidas à pesquisa deste patógeno, sendo *L. monocytogenes* encontrada em 105 (5,1%) amostras (KALOREY, et al., 2008).

No México foram analisadas 1300 amostras de leite cru, *Listeria* spp foi detectadas em 300 (23,0%), das quais 162 (13,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*, além de serem detectadas *L. ivanovii* (6,0%), *L. seeligeri* (4,0%) e *L. innocua* (1,0%) (CARLOS; OSCAR; IRMA, 2001).

Na Suécia, Waak; Than; Danielsson-Tham (2002) encontraram listeria em 10 (3,4%) das 294 amostras de leite cru, sendo *L. monocytogenes* detectada em 3 (1%) e *L. innocua* em 7 (2,3%).

Nos EUA, em uma pesquisa com 861 amostras de leite cru coletadas de resfriadores, *L. monocytogenes* foi isolada de 56 (6,5%) amostras (VAN KESSEL, KARNS; GORSKI, 2004).

3.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bastonete Gram negativo, aeróbio, anaeróbio facultativo e é a espécie predominante da microbiota intestinal de animais de sangue quente. É isolada com frequência em alimentos e em produtos lácteos, incluindo os armazenados sob refrigeração (FDA, 2001; NATARO; KAPER, 1998). Apresenta diversas linhagens comprovadamente patogênicas para o homem e animais e sua presença nos alimentos indica uma possível contaminação de origem fecal, assim como eventual ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2007). Com base nos

fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas, as linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são agrupadas em 5 classes: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

A EPEC está associada à diarreia infantil. A duração da doença varia de seis horas a três dias, com período de incubação entre 17 e 62 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2007). A doença causada pela EPEC é atribuída a uma verotoxina e pode ocasionar diarreia prolongada, levando à desidratação e 50% de mortalidade, principalmente nos países de terceiro mundo (FDA, 2001). As cepas de EIEC são responsáveis pela disenteria bacilar, doença caracterizada por fezes muco sanguinolentas, e são capazes de penetrar em células epiteliais. O período de incubação varia entre 12 e 72 horas e a dose infectante é baixa, pouco menos de 10 células. Acomete mais crianças e adultos, tendo como complicação a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), especialmente em casos pediátricos (FDA, 2001). ETEC causa gastroenterite e as cepas são capazes de produzir enterotoxina, cujo efeito é diarreia aquosa, conhecida como diarreia dos viajantes (FDA, 2001). O período de incubação varia de oito a vinte e quatro horas. A quantidade de microrganismos capazes de gerar infecção é alta, entre 10^6 a 10^8 células (FRANCO; LANDGRAF, 2007). A EHEC produz uma colite hemorrágica que pode evoluir para SHU. O mecanismo de patogenicidade está relacionado com produção de citotoxinas, também chamadas de verotoxinas ou toxina Shiga (*shiga-like*) e com o sorotipo O157:H7. EaggEC adere-se ao cólon com ajuda das fímbrias e é manose resistente. Alguns relatos indicam que estas cepas podem produzir toxinas termolábeis e termoestáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2007).

Em estudo realizado por Nero et al. (2004a) com 204 amostras de leite cru produzidas em quatro regiões do Brasil (Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais), *E. coli* foi detectada em 36,8% das amostras, e em 29,4% as contagens foram superiores a 100 UFC/mL.

Moraes et al. (2005) analisaram amostras provenientes de 42 propriedades leiteiras localizadas em cinco municípios no Estado do Rio Grande do Sul (Esteio, Gravataí, Glorinha, Sapucaia do Sul e Viamão) e isolaram *E. coli* em 8 (19,0%).

Campos et al. (2006) analisaram 24 amostras de leite cru coletadas em um laticínio em Goiás, encontraram em 19 (79,2%) a presença de *E. coli*.

Na Malásia *E. coli* foi isolada de 600 (64,5%) das 930 amostras testadas (CHYE; ABDULLAH; AYOB, 2004).

No Paquistão, Soomro et al. (2002) verificaram que 9 (45%) das 20 amostras de leite coletadas em fazendas estavam contaminadas com *E. coli*.

3.3. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos encontrados em vários habitats, particularmente aqueles ricos em nutrientes, tais como alimentos, e vegetais. Outros habitats incluem solo, água, água de esgoto, silagem (AXELSSON, 2004).

São Gram positivos, usualmente catalase negativos, não formadores de esporos, com crescimento em microaerofilia ou anaeróbiose, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, apresentando o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (AXELSSON, 2004; DALEZIOS; SIEBERT, 2001; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003). Seus gêneros tradicionais são: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005, 2005).

Na indústria de alimentos as BAL vêm sendo aplicadas como culturas iniciadoras em vários alimentos fermentados, como carnes, derivados lácteos, cereais e vegetais (TEUSINK;

SMID, 2006), contribuindo com as características organolépticas e preservação do produto final (GHRAIRI et al., 2004).

As BAL também têm sido muito utilizadas como probióticos para humanos e animais, sendo associadas a inúmeros benefícios para a saúde, como prevenção a desordens intestinais, redução à intolerância a lactose, aumento da resposta imune, absorção de colesterol e prevenção de câncer (LIN et al, 2006; MARAGKOUidakis et al., 2006).

Com relação à saúde pública, são potencialmente importantes no controle de microrganismos indesejáveis em alimentos, pois podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de vários mecanismos: competição por oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonistas (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003). A produção de ácido láctico, associado aos outros ácidos, como acético e propiônico, contribui para controle de microrganismos, pois gera no alimento uma acidez que usualmente não é favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias Gram positivas e negativas, além de fungos e leveduras (ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Uma série de substâncias antagonistas com potencial antimicrobiano já está amplamente descrita, como o peróxido de hidrogênio, diacetil e as bacteriocinas (LEWUS; MONTVILLE, 1991).

As bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas e caracterizadas por possuírem atividade contra um grupo específico de microrganismos sensíveis (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; LEWUS, MONTVILLE, 1991). Tradicionalmente, as bacteriocinas têm sido definidas como compostos proteináceos, produzidos por bactérias que inibem (efeito bacteriostático) ou destroem (efeito bactericida) outras bactérias. Contrastam com os antibióticos considerados ilegais como conservadores pelo fato de não apresentarem utilização no tratamento de doenças infecciosas, não interferindo na resistência bacteriana. Além das BAL, outros microrganismos são capazes de produzir bacteriocinas: desde Gram negativos, como *E. coli*

com produção de colicinas, aos outros microrganismos Gram positivos, como algumas espécies de estafilococos. Entretanto, as BAL são consideradas atualmente os microrganismos produtores de bacteriocinas mais importantes (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; RILEY; WERTZ, 2002). *Lactococcus lactis* app. *lactis* é o produtor da principal e mais estudada bacteriocina isolada: Nisina A (ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Essa bacteriocina possui uma ampla atividade antimicrobiana contra microrganismos Gram positivos, incluindo esporos (STILES, 1994). A nisina é a única bacteriocina disponível comercialmente para utilização em alimentos, é permitida para uso aproximadamente em 50 países, inclusive o Brasil onde ela é aprovada para o uso em todos os tipos de queijos, e também é aplicada na superfície externa de salsicha de diferentes tipos. É atóxica, destruída por enzimas digestivas e não confere sabores e odores desagradáveis em alimentos (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003; DE MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003).

A atividade antagonista de BAL em relação a patógenos já foi verificada em queijos (GURIRA; BUYS, 2005; RAMÍREZ et al., 2005; GHRAIRI et al., 2004; ALEXANDRE; SILVA; SANTOS, 2002; GUERRA; BERNARDO, 2001; RODRIGUES et al., 2001), em produtos cárneos (ALBANO et al., 2007; BROMBERG et al., 2004; DE MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003; MACIEL et al., 2003; DABÉS; SANTOS; PEREIRA, 2001; DE MARTINIS et al., 2001; PARENTE; GRIECO; CRUDELE, 2001; PRADO et al., 2000; DE MARTINS; FRANCO, 1998) e leite (NERO et al., 2004b).

Também deve-se considerar que altas contagens de BAL podem ser problemáticas pois esses microrganismos podem fermentar rapidamente a lactose presente no leite, resultando em formação de sabor indesejável e, em precipitação de proteínas em pH abaixo de 4,6 (HAYES; BOOR, 2001).

4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PRODUZIDO NO BRASIL

De modo geral o leite produzido no Brasil é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes e, como consequência, apresenta baixa qualidade microbiológica, o que gera a fabricação de leite beneficiado e derivados com baixa qualidade (CATÃO, SEBALLOS, 2001; PADILHA et al., 2001; MARTINS, ALBUQUERQUE, 1999). A baixa qualidade do produto pode ser atribuída a deficiências no manejo e higiene de ordenha, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente e mão de obra desqualificada (NELSON, 1992).

Essa qualidade microbiológica é bastante conhecida em diferentes regiões brasileiras, predominando altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes e presença de patógenos (BELOTI et al., 2006; CAMPOS et al., 2006; NERO et al., 2006; MORAES et al., 2005; NERO et al., 2004a; BELOTI et al., 2002; CATÃO, SEBALLOS, 2001; PADILHA et al., 2001; FRANCO et al., 2000; BELOTI et al., 1999).

Em pesquisa realizada por Beloti et al. (2006) e Nero et al. (2006), leite cru de 53 propriedades localizadas no Agreste de Pernambuco foram analisadas quanto à sua qualidade microbiológica e apresentaram altas contagens de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Ainda, 81,1% das amostras apresentaram contagens de aeróbios mesofilos acima de 10^6 UFC/mL, padrão estabelecido pela IN 51 (BRASIL, 2002).

Nero et al. (2005) pesquisaram a qualidade microbiológica em 210 amostras de leite cru produzidas em quatro regiões do Brasil (Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais), e evidenciaram a baixa qualidade do leite produzido nessas regiões, já que uma parcela relevante das amostras (48,6%) apresentou contagens acima de 10^6 , padrão vigente determinado pela IN 51 durante a realização do experimento, sendo 21,3% na região de

Viçosa (MG), 56,0% na região de Pelotas (RS), 47,6% na região de Londrina (PR) e 68,0% na região de Botucatu (SP).

Moraes et al. (2005) analisaram amostras provenientes de 42 propriedades leiteiras, localizadas no Rio Grande do Sul, encontraram altas contagens de coliformes totais e isolaram *E. coli* em 19,5% das amostras. Entre as 12 propriedades testadas quanto ao número de aeróbios mesófilos, 9 (75%) ficaram fora padrões determinados pela IN 51, pois apresentaram contagens superiores a 10^6 .

Rosa e Queiroz (2007) analisaram 20 amostras de leite cru provenientes do município de Canguçu (RS) e encontraram que 80,0% das amostras apresentam contagens de microrganismos aeróbios mesófilos acima de 10^6 , limite estabelecido pela IN51.

Lamaita et al. (2005) no estado de Minas Gerais, pesquisaram *Staphylococcus* spp. em 80 amostras de leite cru refrigerado em tanques de expansão por 48 horas, e detectaram este microrganismo em 100% das amostras, com contagens que variaram de $1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL, com média igual a $3,99 \times 10^5$ UFC/mL. Isolaram-se e identificaram-se *S. aureus* em 34,6% das amostras, *S. hyicus* em 22,7%, *S. epidermidis* em 12,2%, *S. cohnii* em 9,4%, *S. sciuri* em 9,4%, *S. schleiferi* em 5,7%, *S. intermedius* em 3,2% e *S. delphini* em 1,1%.

Arcuri et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica de leite de 24 rebanhos situados nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do Rio de Janeiro, e verificaram que 4 (17%) rebanhos não atenderiam o requisito de 10^6 imposto pela IN 51. Ainda, *S. aureus* foi encontrado em 16 (66,6%) rebanhos, e as contagens de coliformes totais foram superiores a 100 UFC/mL em 19 (79,2%) rebanhos.

Padilha et al. (2001) pesquisando 50 amostras de leite cru produzidos na região metropolitana de Recife-PE. Detectaram *Salmonella* Montevideo, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp, *Erwinia* sp, *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp e *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia*.

Catão e Seballos (2001) detectaram *Listeria* spp. em 33 (73,3%) das 45 amostras de leite cru analisadas proveniente dos Estados da Paraíba e Pernambuco, sendo que em 17 (37,78%) havia a presença de *L. monocytogenes*.

Com o objetivo de melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil foi editada em 2002 a Instrução Normativa 51 (Brasil, 2002) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária, que estabeleceu novas normas de produção e processamento de leite, como a refrigeração na propriedade, o transporte a granel, e estabelecer padrões de aeróbios mesófilos (AM) e contagem de células somáticas (CCS) para leite cru, entre outras modificações.

Uma das principais alterações diz respeito ao leite tipo C. O leite pasteurizado tipo C foi extinto no país e foi substituído pelo leite Pasteurizado que também possui novos parâmetros de qualidade. O leite cru destinado ao beneficiamento do leite tipo C pasteurizado não possuía parâmetros microbiológicos de qualidade. De acordo com as novas normas, esse leite passará a ser denominado “leite cru refrigerado” e deverá ser refrigerado já na propriedade, além de possuir uma contagem de AM máxima de 10^6 UFC/mL, e de CCS máxima de 10^6 a partir de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste e a partir de 2007 nas regiões Norte e Nordeste. O plano de melhoria de qualidade no Brasil estabelece que as contagens de AM não ultrapassem 10^5 e que a CCS máxima seja de 4×10^5 a partir de julho de 2011 nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste e a partir de julho 2012 nas regiões Norte e Nordeste.

Outra norma descrita na IN51 é a regulamentação de conservação, coleta e transporte de leite cru, que independente do tipo, deve ser feita a granel. Nas propriedades, o leite cru deverá ser refrigerado e atingir a temperatura de 4°C (tanques de expansão) ou 7°C (tanques de imersão), num período não superior a 3 horas. Uma alternativa para resfriamento do leite é a adoção de tanques resfriadores comunitários, prevista pela IN51 e que visa atender pequenos produtores. A coleta granelizada é realizada por caminhões-tanque, que coletam o leite refrigerado nas propriedades e o encaminham, em compartimentos refrigerados, a

laticínios para processamento. Na recepção dos laticínios, o leite desses tanques não deverá apresentar temperatura superior à 10°C, independente do tipo.

5. REFERÊNCIAS

- ALBANO, H.; OLIVEIRA, M.; AROSO, R.; CUBERO, N.; HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. **Meat Science**, Barking, v.76, n.4, p.796-800, ago. 2007.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, SANTOS, W. M. L. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.4, p.424-428, ago. 2002.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, G. F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, jun. 2006.
- AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEM, S.; von WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Eds.) **Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004 p.1-66.
- AYGUN, O; PEHLIVANLAR, S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. **Food Control**, Guildford, v.17, n.8, p.676-679, ago. 2006.
- BELL, C., KYRIAKIDES, A. **Listeria: A practical approach to the organism and its control in foods**. London: Chapman & Hall, 1998, p. 1-7.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina, Ciências agrárias**, Londrina, v.20, n.1, p.12-15, jan./jun.1999.
- BELOTI, V.; SANTANA, E. H. W.; FAGAN, E. P.; BARROS, M. A. F.; PEREIRA, M. S.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; MATTOS, M. R.; NERO, L. A.; VACCARELLI, E.R.; SILVA, L. H. C.; MAGANANI, D. F.; HAGA, M. M. Principais pontos de contaminação na produção leiteira e implementação de boas práticas. In: II Congresso Panamericano de qualidade do leite e controle de mastite, 2002, Ribeirão Preto SP. **CD-Rom...** 2002.
- BELOTI, V.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. i C; MAGNANI, D.; MONTEIRO, A. A. ; BARROS, M. A. F.; MATTOS, M. R.; MORAES, L. B.; FAGAN, E. P. ; SILVA, W. P. ; PIRES, E. M. F. Obtenção de leite com qualidade através da implantação de Boas práticas na ordenha, em quaisquer condições de Produção. In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, II Congresso Estadual da ANCLIVEPA, IV Encontro de Medicina de Pequenos Ruminantes do CONESUL, 2006, Gramado, RS. **CD-Rom ...** 2006. v. 1.
- BOOR, K. J. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.17, n.11, p.714-717, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de maio 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Rio de Janeiro, 7 jun. 1952, p.10.785.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 set. 2002, p.13, Seção 1.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C. L.; DELBONI, R. R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, v.1-2, p.137-144, jan./jun. 2004.

CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CARLA ATAVILA DA SILVA VIEIRA; JAYME, L. B.; SANTOS, P. S.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, jul./ago. 2006

CARLOS, V.; OSCAR, R.; IRMA, E. Q. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food Microbiology**, v.18, n.2, p.177-181, abr. 2001.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.28. n.4, p.281-370, dec. 2002.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, set./dez. 2001.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology Handbook: The microbiology of milk and milk products**. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. p.39-90

CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, London, v.21, n.5, p.535-541, out. 2004.

CONAB - CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura Regional Pernambuco. 2004**. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br/download/sureg/PE/conjuntura01.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2006.

COUSIIN, M. A. Presence and activity psychotrophic microorganisms in milk and dairy products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.45, p. 172, 1982.

DABÉS, A. C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.1, p.136-140, fev. 2001.

DALEZIOS, I.; SIEBERT, K. J. Compararison of pattern recognition techniques for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, n.2, p.225-236, ago. 2001.

DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.42, n.1-2, p.119-126, jun. 1998.

DE MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO; M. R. P.; SANTAROSA; P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from acuumpackaged brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.1, p.32-37, jan./mar. 2001.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.114-119, nov./dez. 2003.

DE MARTINIS, E. C. P.; SANTAROSA; P. R.; FREITAS, F. Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p.195-199, maio-ago. 2003.

DHANASHREE, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; GOEBEL, W.; KARANASAGAR, I. Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. **Food Microbiology**, London, v.20, n.4, p.447-453, ago. 2003.

DYKES, G.A Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.85, n.3, p.301-306, ago. 2003.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Agropecuária**. Disponível em <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 9 jan. 2008.

FDA. Center of Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook - Bad Bug Book. Escherichia coli O157:H7**. Estados Unidos, Jan. 2001. Disponível em <<http://vm.cfsan.fda.gov/%7Emow/chap15.html%20>>. Acesso em: 20/02/06.

FIGUEIROA, J. G. **O sinal verde para a reestruturação da agroindústria do leite no agreste**. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigos.php?id=240>>. Acesso em: 1 fev. 2006.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. São Paulo: Manole, 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.68/69, p.70-77, jan./fev.2000.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Atheneu, 2007. 2 edição

GHRAIRI, T.; MANAI, M.; BERJEUD, J. M.; FRERE, J. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, n.3, p.621-628, set. 2004.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, London, v. 21, p.217-225, abr. 2004.

GUERRA, M. M. M.; BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.96, n.538, p.65-69, abr./jun. 2001.

GURIRA, O. Z.; BUYS, E. M. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species. **Food Microbiology**, London, v.22, n.2-3, p.158-168, abr./jun. 2005.

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw Milk and Fluid Milk Products. In: _____ **Applied Dairy Microbiology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker , 2001. p.59-76.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. Aspen: Publishers, Gaithersburg, MD. 2005.

KALOREY, D. R.; WARKE, S. R; KURKURE, N. V.; RAWOOL, D. B., BARBUDDHE, S.B. *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. **Food Control**, Guildford, v.19, n.2, p.109-112, fev. 2008.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; DANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.5, p.702-709, out. 2005.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.13, n.2, p.145-150, jun. 1991.

LIN, Y.; CHOU, C. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. **Food Microbiology**, London, v.21,n.5, p.605-610, out. 2004.

LIN, W.; HWANG, C.; CHEN, L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v.23, n.1, p.74-81, fev. 2006.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.80/81, p.39-48, jan./fev. 2001.

LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos**: vaca, oveja, cabra. Zaragoza: Acribia, 1991. v.1

MACIEL, J. F.; TEIXEIRA, M. A.; MORAES, C. A.; GOMIDE, L. A. M. Antibacterial activity of lactic cultures isolated of italian salam. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, n.1, p.121-122, jan./abr. 2003.

MARAGKOUidakis, P. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potencial of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n.3, p.189-199, mar. 2006.

MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. Qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Fortaleza. Bactérias multiresistentes a antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.39-42, jan./fev. 1999.

MCLAUCHILIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 15-33, abr. 2004.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different foods products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, London, v.21, p. 213-216, abr. 2004.

MORAES, C. R.; FUENTEFRIA, A. M. F.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.3, p.259-264, 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.11, n.2, p.142-201, abr, 1998.

NELSON, J. H. An overview of good manufacturing practice -1. Bulletin of the **International Dairy Federation**, Brussels, v.276, p.10-11, 1992.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, n.3, p. 211-215, jul./set. 20a.

NERO, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; VILLAS-BÔAS, A. M.; TAMANINI, R. Microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista em relação à *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **CD-Rom...** Passo Fundo, 2004b

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil**: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 2005. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e pesquisa de microrganismos patogênicos no leite produzido na região agreste de Pernambuco. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.. **CD-Rom ...** São Paulo : TecArt, 2006. p. 1485-1485.

OKUTAMI, A.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.93, p.131-140, jun. 2004.

ORRISS, G. D. Animal diseases of public health importance. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.3, n.4, p.497-502, out./ nov. 1997.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F. F.; LEAL, T. C. A. L.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.34, n.2, p.161-171, mar./abr., 2001.

PARENTE, E.; GRIECO, S.; CRUDELE, M. A. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, n.6, p.943-952, jun. 2001.

PRADO, C. S.; SANTOS, W. L. M.; CARVALHO, C. R.; MOREIRA, E. C.; COSTA, J. O. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.4, p.417-423, ago. 2000.

PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2001.

RAMÍREZ, S.; SANTOS, E. M.; ZÚÑIGA, A.; ROMÁN, A. D.; ORTIZ, M.; CLAVEL, M.; NERIA, A.; SÁNCHEZ, I. Aislamiento y Detección de la Actividad Antimicrobiana de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) Aisladas de Quesos. In: Congresso Nacional de Ciencia de los Alimentos, 7., Guanajuato, Gto, **Anais...**, Guanajuato, Gto, México, 2005. p.279-284.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário de Alimentos**. 2º edição. São Paulo: Atheneu, 1992.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v.56, p.117-137, out. 2002.

RODRIGUES, E.; ARQUÉS, J. L.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.68, n.1, p.131-137, fev. 2001.

ROSA, L. D.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p.422-430, abr./jun. 2007.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.79, n.1-2, p.3-16, nov. 2002.

SOOMRO, A. H.; ARAIN, M. A.; KHASKHELI, M.; BHUTTO, B. Isolation of *Escherichia Coli* from raw milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at tandojam. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.1, n.3, p.151-152, maio/jun. 2002.

SPRRA - SECRETARIA DE PRODUÇÃO RURAL E REFORMA AGRÁRIA. **Programa leite de Pernambuco**. Disponível em: <http://www.producaorural.pe.gov.br/leite/o_programa.htm>. Acesso em: 7 nov.. 2006.

STILES, M. E. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. **Journal of Dairy Science**, Champaign v.77, n.9, p.2718-2724, set. 1994.

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilmes. **Biofilms**, Cambridge, v.1, n.4, p.351-359, out. 2004.

TEUSINK, B.; SMID, E. J. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.4, n.1, p.46-56, jan. 2006.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Disponível em <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 11 jan. 2008.

VAN KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; GORSKI, L. A.; MCCLUSKEY, B. J.; PERDUE, M. L. Prevalence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and fecal coliforms in bulk tank milk on U.S. dairies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.9, p. 2822-2830, set. 2004.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3366-3370, jul. 2002.

WALLS, I.; BUCHANAN, R.L.; Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. **Food Control**, Guildford, v.16, n.9, p.795-799, nov. 2005.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Detectar a presença de *Listeria monocytogenes*, quantificar *Escherichia coli* em leite cru produzido na região agreste de Pernambuco e estudar bactérias ácido lácticas naturalmente presentes neste leite com atividade antagonista em relação aos patógenos citados.

Objetivos específicos:

- Verificar a presença de *Listeria monocytogenes* e quantificar coliformes totais e *Escherichia coli* no leite cru em amostras de leite proveniente de propriedades leiteiras do Agreste de Pernambuco;
- Estimar a população de bactérias ácido lácticas presentes no leite cru em amostras de leite proveniente de propriedades leiteiras do Agreste de Pernambuco;
- Verificar se as bactérias ácido lácticas presentes no leite cru possuem atividade antagonista em relação à *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU COM ATIVIDADE
ANTAGONISTA A *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* .**

BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU COM ATIVIDADE

ANTAGONISTA A *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* .

RESUMO

As Bactérias Ácido Láticas (BAL) são microrganismos naturalmente encontrados em vários alimentos e possuem importância no controle de microrganismos patogênicos em alimentos, pois produzem uma série de substâncias com potencial antimicrobiano, que afetam microrganismos, como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Com o objetivo de verificar a presença de *L. monocytogenes*, enumerar *E. coli*, estimar as contagens de BAL, e verificar a atividade antagonista das BAL isoladas em relação a *L. monocytogenes* e *E. coli* foram coletadas amostras de leite cru de 45 propriedades leiteiras da região agreste de Pernambuco. Para detecção de *L. monocytogenes* foi utilizado o sistema VIDAS Listeria (bioMérieux) e para enumeração de *E. coli* foi utilizado Petrifilm™ EC (3M) com incubação a 35°C por 48 horas. Para contagem de BAL as amostras foram diluídas em caldo MRS e semeadas em placas de Petrifilm™ AC (3M), com incubação a 30°C por 72 horas em microaerofilia. O antagonismo aos patógenos foi determinado através da metodologia *spot-on-the-lawn* modificada, utilizando a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 25922. Para isso foram selecionadas 671 culturas de BAL isoladas das 45 amostras. Em nenhuma amostra de leite foi detectada a presença de *L. monocytogenes* e contagens de *E. coli* variaram de $< 1,0 \times 10^3$ UFC/mL a $1,3 \times 10^5$ UFC/mL. As contagens de BAL variaram de $11,1 \times 10^4$ UFC/mL a $9,9 \times 10^6$ UFC/mL. Das culturas testadas com relação à capacidade antagonista a *L. monocytogenes*, 549 (81,8%) apresentaram atividade antagonista, sendo que 410 (61,2%) com inibição total e 139 (20,7%) com inibição parcial. Quanto a *E. coli*, 258 (38,5) culturas apresentaram atividade antagonista, sendo todas com inibição parcial. As altas contagens de *E. coli* encontradas constituem um risco para a saúde e indicam possível contaminação por outros enteropatógenos. A alta frequência de BAL com capacidade antagonista a *L. monocytogenes*, pode ser responsável pela ausência deste patógeno nas amostras de leite estudadas.

Palavras chave: leite, bactérias lácticas, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, antagonismo

LACTIC ACID BACTERIA ISOLATE OF RAW MILK WHIT ANTAGONIC TO

Listeria monocytogenes AND *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are microorganisms naturally found in several foods that have an important role in controlling pathogenic microorganisms in food since they are able to produce numerous substances with antimicrobial antagonistic potential, that affect microorganisms such as *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Aiming to verify the presence of *L. monocytogenes*, enumerate *E. coli* and LAB, and verify the antagonistic activity of isolated LAB against *L. monocytogenes* and *E. coli*, samples of raw milk were collected from 45 milk farms from Agreste region of Pernambuco. For *L. monocytogenes* detection VIDAS Listeria (bioMerieux) system was used and for *E. coli* enumeration Petrifilm™ EC (3M) was used and incubated at 35°C for 48 hours. For LAB counting samples were diluted in MRS broth and distributed Petrifilm™ AC (3M) plates, incubated for 72 hours on microaerophilic conditions. Pathogens antagonism was determined through *spot-on-the-lawn* modified methodology using *L. monocytogenes* ATCC 7644 and *E. coli* ATCC 25922 strains. In order to do that 671 LAB cultures isolated from the 45 samples were selected. *L. monocytogenes* was not detected in any milk sample and *E. coli* counting varied from $< 1, 0 \times 10^3$ to $1,3 \times 10^5$ CFU/mL. LAB counting varied from $11,1 \times 10^4$ to $9,9 \times 10^6$ CFU/mL. Cultures tested for antagonistic capacity against *L. monocytogenes*, were antagonistic in 549 (81,8%) samples, from which 410 (61,2%) showed total inhibition and 139 (20,7%) partial inhibition. Concerning *E. coli*, 258 (38,5) cultures showed antagonist activity, all with partial inhibition. High counts of *E. coli* found constitute a risk to health and indicate potential contamination by other enteropathogens. Elevated frequency of LAB antagonistic to *L. monocytogenes* can be responsible for the absence of this pathogen in milk samples studied.

Key words: milk, lactic bacteria, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, antagonism

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto produtor mundial de leite fluido, com aproximadamente 25,4 bilhões de litros em 2006 (FAO, 2008, IBGE, 2008) Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional, com 27,9% do total produzido e Pernambuco ocupa a décima posição no “ranking” nacional sendo o segundo maior produtor da região Nordeste, com uma produção de 630,3 milhões de litros em 2006 (IBGE, 2008). Atualmente cerca de 14 mil pequenos e médios produtores estão na atividade leiteira em Pernambuco, concentrados principalmente na região Agreste, que apresentou em 2006 uma produção de 393.778 mil litros, representado 74,79 % da produção do Estado (CONAB, 2006; IBGE, 2008; SPRRA, 2006).

Em 2005 cerca de 50% de toda a produção leiteira no Brasil não passou por nenhum tipo de inspeção (IBGE, 2008), e teve como provável destino o comércio informal, mesmo sendo proibido desde 1952 (Brasil,1952). Esse leite cru pode representar uma importante fonte de transmissão das Enfermidades de Origem Alimentar, pois pode carrear vários patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (CHAMBERS, 2002; RIEDEL, 1992). O risco torna-se maior devido a usual produção de diversos tipos de derivados com leite cru, como queijos, cuja produção não emprega nenhum tratamento térmico como a pasteurização e conserva os eventuais patógenos presentes na matéria prima (ORRISS, 1997).

De modo geral o leite produzido no Brasil é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes (CATÃO, SEBALLOS, 2001; PADILHA et al., 2001; MARTINS, ALBUQUERQUE, 1999), predominando altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes e presença de patógenos (BELOTI et al., 2006; CAMPOS et al., 2006; NERO et al., 2006a; MORAES et al., 2005; NERO et al., 2004a; BELOTI et al., 2002; CATÃO, SEBALLOS, 2001; PADILHA et al., 2001; FRANCO et al., 2000; BELOTI et al., 1999).

Em algumas pesquisas a qualidade microbiológica ruim tem associada à baixa incidência de patógenos. Entretanto, quando se verifica uma melhoria da qualidade microbiológica a incidência de patógenos tende a ser maior (GUERRA et al., 2001; JAY, 1995). Isso pode ser explicado principalmente devido à presença natural de uma microbiota com grande potencial inibitório. Provavelmente as Bactérias Ácido Lácticas (BAL), naturalmente presentes no leite, são responsáveis por essa inibição. As BAL são produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocina. Todos esses compostos podem prejudicar o desenvolvimento de bactérias deterioradoras e patogênicas presentes nos alimentos (HUGAS, 1998),

O presente trabalho teve como objetivo pesquisar *L. monocytogenes* e *E. coli* no leite cru e identificar a presença de BAL com atividade antagonista a esses patógenos, em amostras colhidas em propriedades leiteiras do Agreste de Pernambuco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

Com o auxílio da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária de Pernambuco (SPRRA) e da Cooperativa dos Produtores de Leite e Derivados de Pernambuco (COOPROL) foram selecionadas 45 propriedades que representassem as características de produção predominantes da região Agreste do Estado de Pernambuco. Para realização do experimento foram colhidas 45 amostras de leite cru diretamente de propriedades de quatro municípios: São Bento do Una, Bom Conselho, Saloá e Águas Belas.

As amostras foram coletadas de latões, através da realização de *pool*, e de resfriadores, em *bags* estéreis (Nasco[®], Estados Unidos), que foram mantidas em temperatura de refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) da Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises.

2.2 Análises Microbiológicas

2.2.1 Diluições

Inicialmente as amostras foram homogeneizadas por agitação e diluídas em escala decimal seriada com solução salina (Nuclear[®], Brasil) estéril 0,85% para pesquisa de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* e em caldo de Man Rogosa Sharpe -MRS (OXOID[®], Inglaterra) estéril, para bactérias ácido lácticas.

2.2.2 Detecção de *Listeria monocytogenes*

Para detecção de *L. monocytogenes* foi utilizado o sistema VIDAS Listeria (bioMerieux[®], França). Para isso 25 mL de cada amostra foram adicionados em 225 mL de caldo Half-Fraser (OXOID[®], Inglaterra) (preparado com metade da proporção indicada pelo fabricante) e incubado a 30°C durante 25 horas. Depois transferiu-se 1 mL da suspensão para 10 mL de caldo fraser (OXOID[®], Inglaterra) incubado a 30°C durante 25 horas. A partir dos tubos positivos (escurecimento do meio devido a hidrólise da esculina) 500 µl foram transferidos para as tiras do VIDAS Listeria (bioMerieux[®], França) e realizada a leitura no equipamento Mini Vidas. A reação é baseada em uma reação de ELISA com liberação um indicativo colorido no caso de resultado positivo. A intensidade da fluorescência é interpretada pelo equipamento. O controle positivo foi realizado utilizando a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644.

2.2.3 Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*

Coliformes totais e *E. coli* foram enumerados utilizando-se placas Petrifilm[™] EC (3M, Estados Unidos) que foram incubadas a 35°C por 24 horas para coliformes totais e 48 horas para *E. coli*. Após a incubação, as colônias azuis com gás na área semeada foram enumeradas como *E. coli* e as colônias vermelhas com gás, acrescidas das azuis com gás, foram enumeradas como coliformes totais. A contagem obtida foi multiplicada pelo inverso da diluição considerada. Os resultados foram expressos em UFC de CT/mL e EC/mL.

2.2.4 Estimativa da contagem de bactérias ácido lácticas

A população de BAL em cada uma das amostras foi estimada utilizando as diluições realizadas em caldo MRS, que foram semeadas em placas Petrifilm™ AC (3M, Estados Unidos), acondicionadas em jarra de anaerobiose com o gerador de microaerofilia (CampyGen™, OXOID®, Inglaterra) e incubadas a 30°C por 72 horas (NERO, 2006b). Enumeraram-se as colônias vermelhas, e a contagem obtida foi multiplicada pelo inverso da diluição considerada. Os resultados foram expressos em UFC de BAL/mL.

2.2.5 Estoque e recuperação das culturas

2.2.5.1 Estoque e recuperação das BAL

Após a enumeração, as placas de Petrifilm™ AC contendo as BAL foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina para verificação da atividade antagônica

Para realização dos testes de antagonismo, as BAL enumeradas anteriormente em Petrifilm™ AC foram recuperadas. Assim, de cada amostra foi escolhida uma diluição que apresentasse as colônias distribuídas mais homoganeamente, e em seguida todas foram repicadas individualmente para caldo MRS, com incubação a 30°C por 72h. Após turvação do caldo, as culturas obtidas foram semeadas em Agar MRS (OXOID®, Inglaterra) e incubadas a 30°C por 72h. Cada colônia recuperada do Petrifilm gerou uma cultura, e das 45 amostras de leite cru obteve-se 671 culturas.

2.2.5.2 Estoque e recuperação dos patógenos

Para realização dos testes de antagonismo foram utilizadas as cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 25922. Ambas as culturas foram estocadas a 4°C em Agar Tripticase de Soja (OXOID[®], Inglaterra) adicionado de Extrato de Levedura (0,6%) (OXOID[®], Inglaterra) (TSA-YE). Para utilização as cepas foram cultivadas em placas com TSA-YE adicionado de sangue de carneiro desfibrinado 5%, incubadas por 24h a 30°C e 35°C para *L. monocytogenes* e *E. coli*, respectivamente. Após a incubação, colônias puras foram semeadas em caldo Tripticase de Soja (OXOID[®], Inglaterra) adicionado de Extrato de Levedura (0,6%) (TSB-YE), e incubadas nas mesmas temperaturas usadas inicialmente. Após turvação do TSB-YE esses inóculos foram utilizados em sobrecamada para verificação da atividade antagonista das BAL.

2.2.6 Verificação do antagonismo

Para verificação da atividade antagonista foi empregada a metodologia *spot-on-the-lawn*, com modificações (LEWUS; MONTIVILLE, 1991).

Cada cultura de BAL recuperada foi semeada pontualmente em quatro placas contendo PCA (Acumedia[®], Estados Unidos). Foram semeadas oito culturas por placa e incubadas a 30°C por 48 horas. Duas placas se destinaram à avaliação de atividade antagonista com relação à *L. monocytogenes* e duas para *E. coli*. Após o crescimento as placas receberam aproximadamente 7 mL de uma sobrecamada contendo o patógeno na concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (escala 0,5 de Mc Farland).

Para a formação da sobrecamada foi retirado 0,1 ml de cada cultura do patógeno em TSB-YE e adicionado ao TSA semi-sólido, preparado com metade da proporção indicada pelo

fabricante e adicionado como sobrecamada às placas contendo as cepas de BAL. Após solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas a 30°C para *L. monocytogenes* e 35°C para *E. coli* por 48h. Halos bem definidos foram classificados como inibição total e halos difusos, foram classificados como inibição parcial (NERO, 2005)

2.3 Análise estatística

Os resultados das contagens dos microrganismos pesquisados foram submetidos a análise estatística utilizando-se o programa *Statistica 6.0*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhuma amostra de leite foi detectada a presença de *L. monocytogenes*, idêntico aos resultados de Nero et al. (2004a) que pesquisaram *L. monocytogenes* em 210 amostras de leite cru produzidas em quatro estados do Brasil (Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais). Arcuri et al. (2006) não encontraram *L. monocytogenes* em pesquisa realizada em 14 rebanhos situados nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do Rio de Janeiro. Padilha et al. (2001) também não encontraram este patógeno pesquisando 50 amostras de leite cru produzidos na região metropolitana de Recife-PE. Já Catão e Seballos (2001) detectaram *Listeria* spp. em 33 (73,3%) das 45 amostras de leite cru dos estados da Paraíba e Pernambuco, sendo que em 17 (37,9%) havia a presença de *L. monocytogenes*.

Estudos realizados em outros países indicam que a frequência de isolamento deste patógeno é bastante variável. Em pesquisa realizada na Turquia, Aygun e Pehlivanlar (2006) não detectaram *L. monocytogenes* em 47 amostras de leite cru estudadas, tendo encontrado *L. ivanovii* e *L. grayi* em apenas 1 (2,2%). Na Índia, *L. monocytogenes* também não foi encontrada em nenhuma das 35 amostras de leite cru analisadas, tendo sido encontrada *L. innocua* em 1 amostra (DHANASHREE et al., 2003). Ainda nesse país, 2060 amostras de leite foram submetidas à pesquisa deste patógeno, sendo *L. monocytogenes* encontrada em 105 (5,1%) amostras (KALOREY, et al., 2008). No México foram analisadas 1300 amostras de leite cru, *Listeria* spp. foram detectadas em 300 (23,0%), 162 (13,0%) positivas para *L. monocytogenes*, e ainda foram encontradas *L. ivanovii* (6,0%), *L. seeligeri* (4,0%) e *L. innocua* (1,0%) (CARLOS; OSCAR; IRMA, 2001). Na Suécia (WAAK; THAN; DANIELSSON-THAM, 2002) encontraram listeria em 10 (3,4%) das 294 amostras de leite cru, sendo *L. monocytogenes* detectada em 3 (1,0%) e *L. innocua* em 7 (2,3%). Nos EUA, em

uma pesquisa com 861 amostras de leite cru coletadas de resfriadores, *L. monocytogenes* foi isolada de 56 (6,5%) amostras (VAN KESSEL, KARNS; GORSKI, 2004).

As contagens de coliformes totais (Tabela 1) variaram $1,5 \times 10^3$ UFC/mL a $2,4 \times 10^6$ UFC/mL. Esses resultados indicam que as condições higiênicas de obtenção do leite foram insatisfatórias, pois é recomendado pela literatura que estas contagens não excedam a 100 UFC/mL (CHAMBERS,2002). Nero et al. (2004a) encontram contagens de coliformes totais acima desse parâmetro em 80,4% das amostras, de leite que estudava. Arcuri et al. (2006) analisaram amostras de 24 rebanhos situados nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do Rio de Janeiro, e encontram contagens de coliformes totais entre 5 UFC/mL e $2,3 \times 10^3$ UFC/mL, sendo que em 19 (79,2%) rebanhos as contagens foram superiores a 100 UFC/mL. Moraes et al. (2005) analisaram amostras provenientes de 42 propriedades leiteiras, localizadas no Rio Grande do Sul, encontraram contagens de coliformes totais entre $2,3 \times 10^3$ e $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. Em estudo realizado na Malásia, quase 90% das 930 amostras estavam contaminadas por coliformes totais, com uma média de contagem de $1,7 \times 10^5$ UFC/mL (CHYE; ABDULLAH; AYOB, 2004).

Tabela 1: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes da região agreste de Pernambuco, de acordo com os resultados de contagens de coliformes totais, *Escherichia coli* e bactérias ácido lácticas e análise estatística.

	<i>Coliformes totais</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bactérias ácido lácticas</i>
	n (%)	n (%)	n (%)
Faixa de Contagem em UFC/mL			
< 1000	0 (0,0)	19 (42,2)	0 (0,0)
1.000 10.000	1 (2,2)	14 (31,1)	0 (0,0)
10.000 100.000	13 (28,9)	10 (22,2)	13 (28,9)
100.000 1.000.000	24 (53,3)	2 (4,5)	13 (28,9)
≥ 1.000.000	7 (15,6)	0 (0,0)	19 (42,2)
Total	45 (100,0)	45 (100,0)	45 (100,0)
Dados estatísticos			
Média	4,4 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁶
Mediana	2,1 x 10 ⁵	1,0 x 10 ³	2,2 x 10 ⁵
Desvio Padrão	5,8 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁶
Variância	3,4 x 10 ¹¹	8,9 x 10 ⁹	4,1 x 10 ¹²

As contagens de *E. coli* (Tabela 1) variaram de < 1, 0 x 10³ UFC/mL a 1,3 x 10⁵ UFC/mL. A presença dessa bactéria tem significado importante, uma vez que existem linhagens patogênicas para homens e animais, é também um indicador de contaminação fecal e eventual presença de outros enteropatógenos. Nero et al. (2004a) encontram *E. coli* em 36,8% das amostras de leite cru, em 29,4% as contagens foram superiores a 100 UFC/mL. Moraes et al. (2005) isolaram *E. coli* em leite cru em 19,0% das amostras de leite. Campos et al. (2006) analisaram 24 amostras de leite cru coletadas em um laticínio em Goiás, encontraram em 79,2% (19,0) a presença desta bactéria. Na Malásia, *E. coli* foi isolada de 600 (64,5%) das 930 amostras de leite cru testadas (CHYE; ABDULLAH; AYOB, 2004). No

Paquistão, Soomro et al. (2002) verificaram que 9 (45,0%) das 20 amostras de leite coletadas em fazendas estavam contaminadas com este microrganismo.

As contagens de BAL (Tabela 1) variaram de $1,1 \times 10^4$ UFC/mL a $9,9 \times 10^6$ UFC/mL.

A Tabela 2 mostra os resultados dos testes de antagonismo realizados com as culturas de BAL isoladas das amostras de leite cru em relação à *L. monocytogenes* e *E. coli*. Foram consideradas antagonistas as colônias em torno das quais se formou um halo translúcido, resultante da inibição de crescimento do patógeno semeado na sobrecamada (Figura 3)..

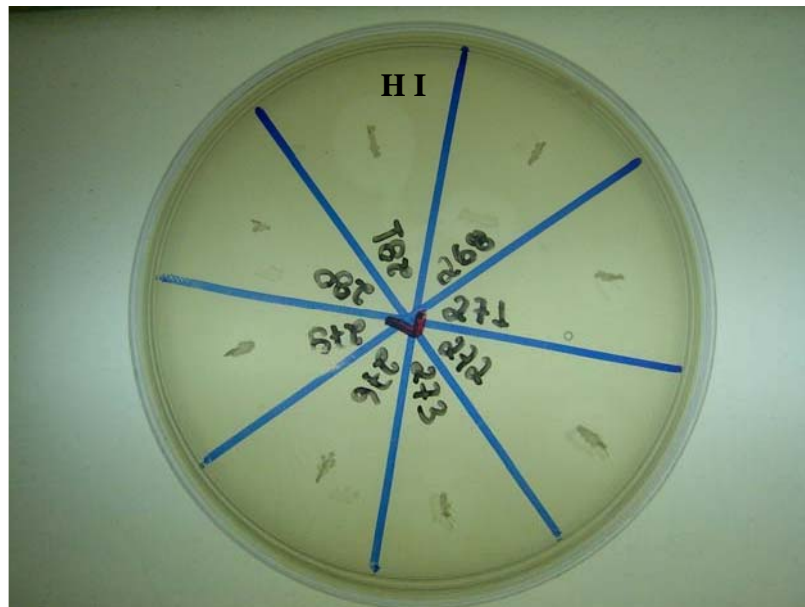


Figura 1: Halo de inibição (HI) do crescimento de *Listeria monocytogenes* provocado por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru.

Considerando à atividade antagonista em relação a *L. monocytogenes*, 549 (81,8%) culturas apresentaram esta atividade, sendo que 410 (61,1%) apresentaram inibição total e 139 (20,7%) inibição parcial. Considerando o antagonismo a *E. coli*, 258 (38,5) culturas apresentaram antagonismo, sendo todas com inibição parcial. Observou-se que a frequência e intensidade do antagonismo das BAL foi maior em relação à *L. monocytogenes* do que à *E. coli*.

Tabela 2: Frequência de Bactérias Ácido Láticas com antagonismo total, parcial e não antagonistas a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* isoladas de 45 amostras de leite cru provenientes da região agreste de Pernambuco.

	Atividade antagonista em relação a			
	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	n	%	n	%
Culturas antagonistas	549	81,8	258	38,5
Total	410	61,1	0	0
Parcial	139	20,7	258	38,5
Culturas não antagonistas	122	18,2	413	61,5
Total	671	100	671	100

Considerando o antagonismo para os dois patógenos 186 (27,7%) culturas apresentaram antagonismo contra ambos, 363 (54,1%) somente contra *L. monocytogenes*, 72 (10,7%) apenas para *E. coli* e 50 (7,5%) colônias não apresentaram antagonismo para ambos.

Vários estudos também comprovam a atividade inibitória das BAL presentes em queijos em relação a *L. monocytogenes*, sendo escassos este tipo de estudo em leite.

Nero et al. (2004b) encontraram uma menor frequência de culturas isoladas de leite cru com atividade antagonista em relação a *L. monocytogenes*. Os pesquisadores isolaram 360 culturas de 15 amostras de leite cru, coletadas na recepção de um laticínio, e 91 (25,5%) apresentaram antagonismo, sendo que 11 (3,1%) foram classificadas como inibição total e 80 (22,2%) classificadas como inibição parcial.

Guerra e Bernardo (2001) utilizaram BAL isoladas de queijos para verificar o efeito antagonista sobre *L. monocytogenes*. De um total de 531 isolados testados, 208 (39,2%) revelaram efeitos antagonistas sobre *L. monocytogenes*. Alexandre et al (2002) avaliaram a

capacidade inibitória de BAL isoladas de "Queijo -Minas do Serro" frente à *L. monocytogenes* e observaram que 29 (15,1%) das 192 cepas testadas apresentaram esta atividade. Ramírez et al. (2005) analisando atividade antagonista de BAL isoladas de diferentes tipos de queijo, encontram apenas 8 (2,4%) das 330 culturas com ação inibitória frente *L. monocytogenes*.

Com relação ao antagonismo a *E. coli* os estudos demonstram uma baixa frequência de BAL antagonistas a este patógeno. Ramírez et al. (2005) encontram apenas 1 (0,3%) com ação inibitória frente *E. coli*. Alexandre et al. (2002) encontraram que nenhuma das culturas testadas apresentou capacidade de inibir o crescimento da *E. coli*.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que *L. monocytogenes* não é um patógeno de relevância no leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco, considerando-se a atual forma de produção.

As altas contagens de coliformes totais indicam que as condições higiênicas de obtenção do leite na região são insatisfatórias.

As altas contagens de *E. coli* constituem um risco para a saúde e indicam possível contaminação por outros enteropatógenos, e confirmam as deficientes condições de obtenção de leite cru na região.

A alta frequência de BAL com capacidade antagonista a *L. monocytogenes* pode ser responsável pela ausência deste patógeno nas amostras de leite estudadas.

As BAL presentes naturalmente no leite cru auxiliam na segurança microbiológica do produto.

5. REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, SANTOS, W. M. L. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.4, p.424-428, ago. 2002.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, G. F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, jun. 2006.
- AYGUN, O; PEHLIVANLAR, S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. **Food Control**, Guildford, v.17, n.8, p.676-679, ago. 2006.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina, Ciências agrárias**, Londrina, v.20, n.1, p.12-15, jan./jun.1999.
- BELOTI, V.; SANTANA, E. H. W.; FAGAN, E. P.; BARROS, M. A. F.; PEREIRA, M. S.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; MATTOS, M. R.; NERO, L. A.; VACCARELLI, E. R.; SILVA, L. H. C.; MAGNANI, D. F.; HAGA, M. M. Principais pontos de contaminação na produção leiteira e implementação de boas práticas. In: II Congresso Panamericano de qualidade do leite e controle de mastite, 2002, Ribeirão Preto SP. **CD-Rom...** 2002.
- BELOTI, V.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. i C; MAGNANI, D.; MONTEIRO, A. A. ; BARROS, M. A. F.; MATTOS, M. R.; MORAES, L. B.; FAGAN, E. P. ; SILVA, W. P. ; PIRES, E. M. F. Obtenção de leite com qualidade através da implantação de Boas práticas na ordenha, em quaisquer condições de Produção. In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, II Congresso Estadual da ANCLIVEPA, IV Encontro de Medicina de Pequenos Ruminantes do CONESUL, 2006, Gramado, RS. **CD-Rom ...** 2006. v. 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de maio 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Rio de Janeiro, 7 jun. 1952, p.10.785.
- CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CARLA ATAVILA DA SILVA VIEIRA; JAYME, L. B.; SANTOS, P. S.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, jul./ago. 2006
- CARLOS, V.; OSCAR, R.; IRMA, E. Q. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food Microbiology**, v.18, n.2, p.177-181, abr. 2001.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, set./dez. 2001.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology Handbook**: The microbiology of milk and milk products. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. p.39-90

CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, London, v.21, n.5, p.535-541, out. 2004.

CONAB - CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura Regional Pernambuco. 2004**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/sureg/PE/conjuntura01.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2006.

DHANASHREE, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; GOEBEL, W.; KARANASAGAR, I. Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. **Food Microbiology**, London, v.20, n.4, p.447-453, ago. 2003.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 9 jan. 2008.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.68/69, p.70-77, jan./fev.2000.

GUERRA, M. M.; MCLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F. A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, London, v. 18,n.4, p.423-429, ago. 2001.

GUERRA, M. M. M.; BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.96, n.538, p.65-69, abr./jun. 2001.

HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Barking, v.49, s.1, p.S139-S150, 1998.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

JAY, J. M. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.15, n.11, p.674-677, 1995.

KALOREY, D. R.; WARKE, S. R.; KURKURE, N. V.; RAWOOL, D. B., BARBUDDHE, S.B. *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. **Food Control**, Guildford, v.19, n.2, p.109-112, fev. 2008.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.13, n.2, p.145-150, jun. 1991.

- MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. Qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Fortaleza. Bactérias multiresistentes a antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.39-42, jan./fev. 1999.
- MORAES, C. R.; FUENTEFRÍA, A. M. F.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.259-264, 2005.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, n.3, p. 211-215, jul./set. 20a.
- NERO, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; VILLAS-BÔAS, A. M.; TAMANINI, R. Microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista em relação à *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **CD-Rom...** Passo Fundo, 2004b.
- NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil**: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 2005. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e pesquisa de microrganismos patogênicos no leite produzido na região agreste de Pernambuco. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.. **CD-Rom ...** São Paulo : TecArt, 2006a.
- NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; TAMANINI, R.; FRANCO, B. D. G. M. Comparison of petrifilm aerobic count plates and de Man–Rogosa–Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Trumbull, v.14, n.3, p.249-257, set. 2006b.
- ORRISS, G. D. Animal diseases of public health importance. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.3, n.4, p.497-502, out./ nov. 1997.
- PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F. F.; LEAL, T. C. A. L.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.34, n.2, p.161-171, mar./abr., 2001.
- RAMÍREZ, S.; SANTOS, E. M.; ZÚÑIGA, A.; ROMÁN, A. D.; ORTIZ, M.; CLAVEL, M.; NERIA, A.; SÁNCHEZ, I. Aislamiento y Detección de la Actividad Antimicrobiana de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) Aisladas de Quesos. In: Congresso Nacional de Ciencia de los Alimentos, 7., Guanajuato, Gto, **Anais...**, Guanajuato, Gto, México, 2005. p.279-284.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário de Alimentos**. 2º edição. São Paulo: Atheneu, 1992.

SOOMRO, A. H.; ARAIN, M. A.; KHASKHELLI, M.; BHUTTO, B. Isolation of *Escherichia Coli* from raw milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at tandojam. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.1, n.3, p.151-152, maio/jun. 2002.

SPRRA - SECRETARIA DE PRODUÇÃO RURAL E REFORMA AGRÁRIA. **Programa leite de Pernambuco**. Disponível em:
<http://www.producaorural.pe.gov.br/leite/o_programa.htm>. Acesso em: 7 nov.. 2006.

VAN KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; GORSKI, L. A.; MCCLUSKEY, B. J.; PERDUE, M. L. Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes* and fecal coliforms in bulk tank milk on U.S. dairies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.9, p. 2822-2830, set. 2004.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3366-3370, jul. 2002.