

## Área: Ciência de Alimentos

# QUANTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E BACTÉRIAS MESÓFILAS AERÓBIAS NO PROCESSO DE HIGIENIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE ORDENHA

Daniela de Avila Silva Bohrz<sup>1</sup>, Nathanyelle Soraya Martins de Aquino<sup>2,\*</sup>, Bruna Webber<sup>1</sup>, Edinara Silva de Lima<sup>3</sup>, Luciane Daroit<sup>4</sup>, Carlos Bondan<sup>3</sup>, Laura Beatriz Rodrigues<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>PPGBioexp, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

<sup>2</sup>PPGCTA, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

<sup>3</sup>Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

<sup>4</sup>ICEG Instituto de Ciências Exatas e Geociências, Universidade de Passo Fundo, RS.

\*E-mail: nathanyelleaquino@gmail.com

**RESUMO** – Foi avaliada a eficácia da higienização de dois processos de ordenha através da quantificação de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias. As coletas foram realizadas em teteiras e água do CIP após a ordenha, após a detergentia e após as sanitizações. Na ordenha 1 a sanitização foi realizada imediatamente ao fim da detergentia e, na ordenha 2, a sanitização foi feita 8 horas depois da detergentia, antes da ordenha subsequente. O tanque de refrigeração foi coletado antes e após o processo de detergentia; o leite do conjunto após as ordenhas. Observou-se que após o processo de higienização das teteiras, houve redução nos níveis de *S. aureus* e bactérias mesófilas aeróbias, porém não houve diferença estatística entre os processos. Na água do CIP houve diferença significativa das bactérias mesófilas aeróbias com o uso da detergentia após a ordenha 1. A carga bacteriana após a detergentia da ordenha 2, comparada com a obtida após o uso do sanitizante, 8 horas depois da detergentia, demonstrou queda significativa ( $P = 0,030$ ), reduzindo  $4,51 \log^{10}$ . Para *S. aureus* a detergentia D1 e D2 e a sanitização S2 diminuíram a contagem bacteriana em relação ao detectado após ordenha, porém não houve diferença estatística entre os pontos ( $P > 0,05$ ). O valor médio do leite do conjunto foi de  $3,04 \log^{10} \text{UFC.mL}^{-1}$  e  $3,11 \log^{10} \text{UFC.mL}^{-1}$  para *S. aureus* nas ordenhas 1 e 2. Não houve diferença significativa para bactérias mesófilas aeróbias e *S. aureus* entre os resultados obtidos antes e após a higienização no tanque de refrigeração.

**Palavras-chave:** ordenha, contaminação, leite, *Staphylococcus aureus*.

## 1 INTRODUÇÃO

A composição química do leite o torna um excelente substrato para a multiplicação de microrganismos. Dentre eles encontram-se patogênicos responsáveis por graves problemas à saúde humana (BRITO et al., 2000). A presença de *Staphylococcus aureus* e de bactérias mesófilas aeróbias no leite está entre os problemas mais comuns dentro das propriedades leiteiras. *Staphylococcus aureus* é o microrganismo patogênico mais frequentemente isolado de leite cru (ZECCHONI & HAHN, 2000). Sua presença no leite cru pode estar relacionada com a saúde das fêmeas em lactação, uma vez que este microrganismo causa infecções nos úberes das vacas, conhecidas como mastite. Estudos têm demonstrado a presença de *Staphylococcus aureus* tanto em animais doentes quanto na pele de animais sadios. Também está presente nos equipamentos de ordenha, pele humana e nas mucosas, sendo o manipulador de alimentos um dos principais responsáveis por veicular este microrganismo aos alimentos. Bactérias mesófilas aeróbias envolvem todos os microrganismos que possuem faixa de crescimento entre 25 e 40°C e se multiplicam na presença de oxigênio, sendo eles patogênicos ou deteriorantes. A alta contagem dessa classe de microrganismos nos alimentos indica uma matéria-prima excessivamente contaminada. A contaminação do leite com essas bactérias se dá, geralmente, devido a falhas nos processos de higienização das tetas antes da ordenha e a falhas nos sistemas de limpeza e sanitização dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração ou utensílios que entram em contato com o leite (BRITO et al., 2000).

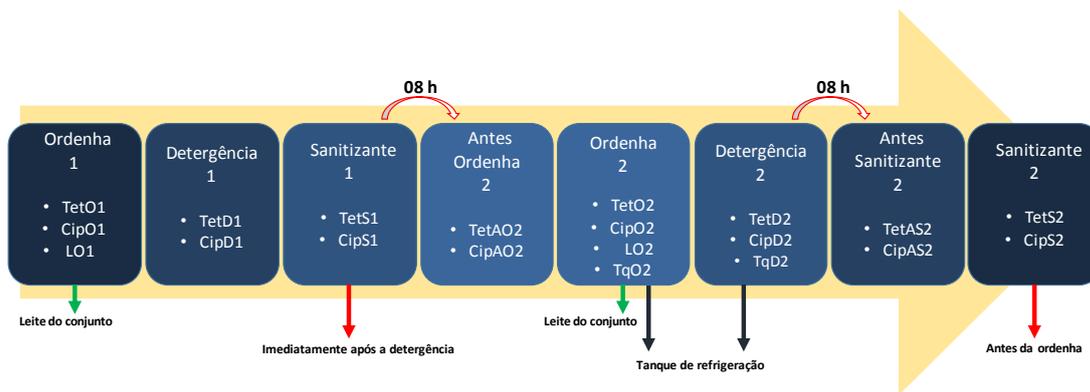
Na higienização de equipamentos na indústria de laticínios e nas propriedades leiteiras comumente utiliza-se o sistema *Clean in Place* (CIP), onde a limpeza e a sanitização de tubulações ocorre em processo fechado, automático, sem desmontagem, utilizando produtos para a detergência e sanitização (ANDRADE, 2008). O objetivo principal do uso de detergentes é a remoção de resíduos orgânicos e minerais, podendo também diminuir a carga bacteriana das superfícies (HOFFMANN, 2002). Já a complementação do uso de sanitizantes no sistema CIP visa melhorar o controle da contaminação microbiana, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (ANDRADE, 2008). Como a contaminação do leite pode ocorrer por via endógena (no caso de animais enfermos) ou exógena (após a saída do úbere), a saúde da glândula mamária, o ambiente de alojamento, a higiene da ordenha e dos equipamentos afetam diretamente a qualidade do leite cru (TRONCO, 2010). Com base na relevância destes temas, o objetivo deste trabalho foi verificar as condições higiênico-sanitárias de equipamentos de ordenha através da quantificação de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias, em teteiras, água do processo *Clean-in-Place* (CIP), tanque de refrigeração e leite do conjunto.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em uma propriedade leiteira no norte do Rio Grande do Sul, com ordenha mecanizada e processo de limpeza com sistema automatizado *Clean in Place* (CIP). A fim de verificar a eficácia da higienização dos equipamentos, superfícies das teteiras de silicone e do tanque de refrigeração de aço inoxidável AISI 304 foram amostradas por *swabs*, e coletadas alíquotas da água do CIP e do leite do conjunto. Para o processo de higienização, além de seguir as recomendações do fabricante dos produtos químicos quanto ao tempo de exposição e concentração a serem utilizados, testaram-se também diferentes tempos entre a etapa de

detergência e de sanitização. Na ordenha 1 a sanitização foi realizada imediatamente ao fim da detergência 1 e na ordenha 2, seguiu-se a recomendação do fabricante, sendo a mesma realizada 8 horas depois da detergência 2, antes da ordenha subsequente, conforme Figura 1. Para higienização das teteiras e tubulações pelo sistema automatizado CIP utilizou-se produtos comerciais à base de hipoclorito de sódio a 3,8% e de ácido fosfórico a 11,3% na etapa de detergência e ácido peracético a 5% para sanitização. O tanque de refrigeração foi higienizado de modo automatizado com detergente alcalino a base de hipoclorito de sódio a 3,8%.

**Figura 1** – Pontos de coleta para a quantificação de bactérias mesófilas aeróbias e *Staphylococcus aureus*.



**Legendas:** **TetO1:** teteiras com resíduos de leite da ordenha 1; **CipO1:** água do primeiro enxágue do processo *Clean-in-Place* (CIP), após a ordenha 1; **LO1:** leite do conjunto da ordenha 1; **TetD1:** teteiras, imediatamente após a detergência da ordenha 1; **CipD1:** água do CIP após a detergência da ordenha 1; **TetS1:** teteiras, após o sanitizante e imediatamente depois da detergência da ordenha 1; **CipS1:** água do CIP após o sanitizante e imediatamente depois da detergência da ordenha 1; **TetAO2:** teteiras após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; **CipAO2:** água do enxágue da tubulação do CIP, após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; **TetO2:** teteiras com resíduos de leite da ordenha 2; **CipO2:** água do primeiro enxágue do processo CIP, após a ordenha 2; **LO2:** leite do conjunto da ordenha 2; **TqO2:** tanque com resíduos após a retirada do leite do conjunto da ordenha 2; **TetD2:** teteiras após a detergência da ordenha 2; **CipD2:** água do CIP após a detergência da ordenha 2; **TqD2:** tanque após a detergência, na ordenha 2; **TetAS2:** teteiras após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; **CipAS2:** água do CIP após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; **TetS2:** teteiras, após o sanitizante, 8 horas depois da detergência da ordenha 2; **CipS2:** água do CIP, após o sanitizante, 8 horas depois da detergência da ordenha 2.

As superfícies das teteiras foram amostradas por *swabs*, utilizou-se molde estéril com área de 4 cm<sup>2</sup> para delimitar a área de coleta. As coletas foram realizadas após a ordenha (O), após a detergência (D) e após as sanitizações (S), sendo as sanitizações realizadas em tempos diferentes na ordenha 1 e 2, conforme mencionado anteriormente. O tanque de refrigeração (Tq) também foi amostrado por meio de *swabs*. Coletaram-se amostras antes da higienização (vestígios de leite) e após o processo de detergência. A água residual do CIP foi coletada em alíquotas de 100 mL, após a primeira passagem pelos equipamentos, após 8 horas do equipamento sem uso e no último enxágue após as etapas de detergências e sanitizações. O leite do conjunto foi coletado após o término das ordenhas, em frascos estéreis, em alíquotas de 100 mL. Todas as coletas foram realizadas em triplicata.

As análises de quantificação foram realizadas segundo as recomendações de EVANCHO et al. (2001). Os resultados obtidos com as análises supracitadas foram analisados por meio de análise de variância e a comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 traz resultados das análises executadas para quantificação de bactérias mesófilas e *S. aureus* dos diferentes pontos de coleta. De acordo com a Tabela 1, podemos notar que as contagens iniciais de *S. aureus* e bactérias mesófilas aeróbias na ordenha 1 e 2 sofreram redução após os processos de detergentia, porém não foi significativa.

**Tabela 1** – Contagem de bactérias mesófilas aeróbias e *Staphylococcus aureus* em teteiras e água do CIP em sala de ordenha mecanizada. Média das repetições.

Pontos de coleta	Mesófilos aeróbios (log <sup>10</sup> UFC.cm <sup>-2</sup> )		<i>S. aureus</i> (log <sup>10</sup> UFC.cm <sup>-2</sup> )	
	Teteiras	CIP	Teteiras	CIP
O1	4,42±2,59 a	7,78±1,43 ab	2,60±2,51 a	2,63±2,51 a
D1	3,38±2,91 a	3,97±1,53 b	0,43±0,75 a	0,00±0,00 a
S1	3,37±2,91 a	5,79±0,88 ab	1,19±2,07 a	0,67±1,15 a
AO2	1,56±2,28 a	5,63±1,53 ab	0,63±1,09 a	1,40±1,59 a
O2	5,13±1,91 a	5,73±1,69 ab	1,46±2,53 a	0,67±1,15 a
D2	2,80±3,38 a	8,30±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
AS2	3,95±2,90 a	5,53±1,26 ab	0,88±1,53 a	0,36±0,62 a
S2	4,03±2,51 a	3,79±2,31 b	0,33±0,58 a	0,00±0,00 a

As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Legendas:** O1: ordenha 1; D1: imediatamente após a detergentia da ordenha 1; S1: após o sanitizante e imediatamente depois da detergentia da ordenha 1; AO2: após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; O2: ordenha 2; D2: detergentia da ordenha 2; AS2: após a detergentia 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; S2: após o sanitizante, 8 horas depois da detergentia da ordenha 2.

Notou-se um aumento de microrganismos após a sanitização 1 e no ponto AS2 (após a detergentia 2, com as teteiras sem uso por 8 horas, coletado antes do sanitizante 2), em ambas ordenhas. Depois do sanitizante 2, a contagem para *S. aureus* reduziu novamente, enquanto que para as bactérias mesófilas houve um leve aumento. Observou-se que não houve diferença estatística significativa entre o processo de sanitização logo após a detergentia ou 8 horas após a detergentia. O mesmo acontece entre os processos de detergentia e sanitização. Em trabalho realizado por Miguel et al. (2012), a média de contagem de bactérias mesófilas aeróbias em teteiras após ordenha foi de 12,81 UFC.cm<sup>-2</sup> e após a higienização foi de 1,09 UFC.cm<sup>-2</sup>. A higienização adequada reduz a contagem bacteriana das superfícies dos equipamentos de ordenha. Corroborando com esta afirmação Cavalcanti (2005), que obteve como média de contagem bacteriana das teteiras higienizadas o valor de 1,8 UFC.cm<sup>-2</sup>.

Na água coletada do processo CIP para bactérias mesófilas aeróbias, na ordenha 1, o uso da detergentia reduziu significativamente o número de bactérias presentes, mas o uso do sanitizante aumentou a contagem. No processo 2 a detergentia aumentou a contagem bacteriana, mas o sanitizante reduziu. Para *S. aureus* a detergentia D1 e D2, e a sanitização S2, diminuíram a contagem bacteriana em relação ao detectado após ordenha. Entretanto, não houve diferença estatística entre os pontos. Neste processo também observou-se um aumento após o uso do sanitizante 1. O sistema CIP, mesmo com as possíveis deficiências e resistências aos

desinfetantes, é comumente utilizado para garantir segurança alimentar e recuperação da planta industrial (ALVAREZ et al., 2010). O que pode justificar o aumento da contagem microbiana após uso de sanitizantes, fato bastante observado neste trabalho, é a resistência adquirida pelos microrganismos. Segundo Langsrud et al. (2003) a resistência aos desinfetantes é preocupante, visto que pode resultar em resistência a agentes antimicrobianos. A resistência cruzada pode ocorrer se dois agentes antibacterianos usarem o mesmo mecanismo de ação ou de resistência. Outro fato que pode explicar este fenômeno é se as recomendações dos fabricantes com relação às diluições dos sanitizantes não forem realmente eficazes na eliminação dos microrganismos. A oscilação nos resultados das quantificações pode dever-se ao fato da possibilidade da existência de biofilmes formados nas superfícies internas das tubulações. O uso dos produtos químicos pode provocar a desadesão bacteriana, com liberação de células planctônicas, mas sem levar à morte microbiana.

Os valores encontrados na superfície do tanque de refrigeração após a ordenha 2, foram de  $4,5 \pm 2,28 \log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$  de bactérias mesófilas aeróbias e  $2,8 \pm 0,73 \log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$  de *S. aureus*. Após a detergência 2, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos antes e após a higienização, com aumento da contagem de mesófilos após a detergência. Segundo a American Public Health Association – APHA (2001) valores superiores a  $2,0 \text{ UFC.cm}^{-2}$  indicam higiene inadequada de superfícies que entram em contato com alimentos. Assim, os resultados obtidos demonstram que o processo de limpeza automatizado no tanque de refrigeração da propriedade estudada foi ineficaz.

O leite do conjunto apresentou  $5,37 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$  no final da ordenha 1 e  $5,17 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$  no final da ordenha 2 para bactérias mesófilas aeróbias. Para *S. aureus* nas ordenhas 1 e 2 apresentou,  $3,04 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$  e  $1,3 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , respectivamente. Os valores encontrados neste estudo para mesófilos aeróbios no leite do conjunto não ultrapassaram as recomendações da IN 62 (BRASIL, 2011) para o ano de 2015, que é de  $5,47 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ . Valores inferiores ao estabelecido pela legislação também foram encontrados por RECHE et al. (2015) ao avaliar a contagem bacteriana total do leite do conjunto de 19 tanques refrigerados de expansão direta, encontraram valores médios de  $4,96 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ . Laranja Da Fonseca & Santos (2000) citaram que 95% dos problemas com altas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios são originários de insuficiências na higiene da ordenha, como lavagem e sanitização inadequada de utensílios e sistema de ordenha deficitária, os quais podem estar associados ao mau resfriamento do leite. Ao quantificar *S. aureus* de leite cru coletados de tanques de refrigeração Picoli et al. (2006), encontraram média de  $3,93 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ , na região de Porto Alegre, RS. Segundo Bergdoll (1990), a partir  $5 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$  o leite apresenta microrganismos em quantidade suficiente para sintetizar enterotoxinas.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo são preocupantes visto que os processos de higienização não foram suficientes para eliminar os microrganismos patogênicos. Mesmo após o processo de higienização CIP, ainda foi quantificado *S. aureus*, possível causador de intoxicações de origem alimentar. A diminuição da carga bacteriana entre as etapas de limpeza não foi considerada significativa, sendo os equipamentos uma fonte em potencial de contaminação do produto final, pela eliminação de microrganismos deteriorantes e patogênicos.

## 5 AGRADECIMENTOS

A Capes/Prosup/UPF por apoiarem esse estudo através da concessão de bolsa.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, N. et al. Recommendations for rationalizing cleaning-in-place in the dairy industry: Case study of an ultra-high temperature heat exchanger. **J. Dairy Sci.** v. 93, n. 2, p.808–821, 2010.
- ANDRADE, N.J. Higienização na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: **Varela**, 2008. 412p.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP (Ed). **Foodborne bacterial pathogens**. INC, New York, 1989. 463-523.
- BRITO, M.A.V.P. et al. Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M.C. et al. MINAS LEITE, 2, 2000, Juiz de Fora. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p.83-94.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, de Leite Cru Refrigerado, de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Instrução Normativa 62. 2011. Seção 1, p.13.
- CAVALCANTI, E. R. C. Construção do conhecimento sobre o potencial de contaminação em ordenhadeiras mecânicas após higienização. 2005. 67f. **Dissertação de Mestrado em Educação Agrícola – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro.
- EVANCHO, G.M. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, p. 25-35, 2001.
- HOFFMANN, F. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana "in vitro" de dois agentes sanificantes de uso industrial. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 94, p. 62-67, 2002.
- LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 283–290, 2003.
- LARANJA da FONSECA, L.F.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Ed. **Lemos**. 2000, cap. 14, p. 151-161.
- MIGUEL, P. R. R. et al. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 403-416, jan./mar. 2012.
- RECHE, N.L.M. et al. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.5, p.828-834, maio 2015. ISSN 0103-8478.
- TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção de Qualidade do Leite**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2010. 203 p.
- ZECCHONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin IDF**, v.345, p.15-18, 2000.