

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA UTILIZADA NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO LEITE¹

LUIZ AUGUSTO DO AMARAL², ANTONIO NADER FILHO², OSWALDO DURIVAL ROSSI
JUNIOR² e LUCIA HELENA DE CARVALHO PENHA³

ABSTRACT.- Amaral L.A., Nader Filho A., Rossi Júnior O.D. & Penha L.H.C. 1995. [**Microbiological characteristics of the water used in the milk production process.**] Características microbiológicas da água utilizada no processo de obtenção do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 15(2/3):85-88. Depto Medicina Veterinária Preventiva, Fac. Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Jaboticabal, SP 14870-000, Brazil.

One hundred samples of the water used for milk production on 10 dairy farms were submitted to counts of total and fecal coliforms, mesophilic microorganisms, *Staphylococcus aureus*, coagulase negative *Staphylococcus* and *Escherichia coli*. The numbers of the indicator microorganisms showed the deficient hygienic and sanitary conditions on the farms. The results showed also the presence of *S. aureus*, coagulase negative *Staphylococcus* and *E. coli* in 4 (4.0%), 52 (52.0%) and 26 (26.0%) samples respectively. The counts indicate that the water examined is a potential hazard for the sanitary conditions of the mammary gland and the microbiological quality of the milk.

INDEX TERMS: Water, hygiene, milk, milking.

SINOPSE.- Foram realizados contagens de coliformes totais, coliformes fecais, microrganismos mesófilos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e de *Escherichia coli* em 100 amostras de água utilizada na higienização de animais, equipamentos e utensílios de ordenha, oriundo de 10 propriedades leiteiras. Além da precária qualidade higiênico-sanitária verificada através das pesquisas dos microrganismos indicadores, os resultados obtidos evidenciaram, também, a presença de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e de *Escherichia coli* em 4 (4,0%), 52 (52,0%) e 26 (26,0%) amostras, respectivamente. Tais achados sugerem que as águas analisadas podem representar importante risco potencial tanto para o estado sanitário da glândula mamária como para a qualidade microbiológica do leite.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Água, higiene, leite, ordenha.

INTRODUÇÃO

Inúmeras propriedades rurais utilizam no processo de obtenção do leite a água oriundo de lençóis subterrâneos, desprovida de qualquer forma de tratamento. Embora não existam padrões específicos para a água empregada com esta finalidade, Robinson (1987) afirma ser necessário que

este produto apresente características bacteriológicas semelhantes às da água potável.

Apesar da enorme confiança demonstrada por produtores e técnicos a respeito da qualidade da água obtida em lençóis subterrâneos, alguns autores concordam em afirmar que este produto pode constituir-se em importante fonte de contaminação bacteriana para o úbere, equipamentos, utensílios e, conseqüentemente, para o leite (Galton 1982).

Vários são os fatores que podem contribuir para a contaminação das águas subterrâneas, dentre os quais destaca-se a ubiquidade de determinados microrganismos, especialmente daqueles pertencentes ao grupo dos coliformes e aos gêneros *Staphylococcus* spp e *Pseudomonas* spp (Robinson 1987, Filip et al. 1988, Schukken et al. 1991).

Segundo Filip et al. (1988), *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Escherichia coli*, podem sobreviver na água por um período de 30, 30 e 300 dias, respectivamente, tempo suficiente para serem carreados ao processo de obtenção do leite. Em decorrência deste fato, além da contaminação e, conseqüentemente, do comprometimento da qualidade deste produto, pode ocorrer um aumento do risco de aparecimento de casos de mastite.

A este respeito, Robinson (1987) afirma que a água de lavagem de úberes quando intensamente contaminadas por *Pseudomonas* spp e coliformes, pode ser responsabilizada por surtos de mastite causada por estes microrganismos.

¹Aceito para publicação em 5 de junho de 1995.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal (Unesp-FCAVJ), Jaboticabal, SP 14870-000.

³Bolsista de Iniciação Científica CNPq, Unesp/FCAVJ.

Segundo Schukken et al. (1991), ocorre um aumento do risco da ocorrência de mastite por *Staphylococcus aureus*, quando a água utilizada na produção do leite não sofre qualquer processo de tratamento.

Tendo em vista o exposto e considerando a ausência de informações a este respeito em nosso meio, idealizou-se o presente estudo com o objetivo de conhecer a qualidade higiênico-sanitária da água oriundo de lençóis subterrâneos empregada no processo de obtenção do leite, e também para obter subsídios que permitam avaliar o risco potencial que a água pode representar para o estado sanitário do úbere para a qualidade microbiológica do leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Propriedades rurais

A pesquisa foi realizada em 10 propriedades rurais produtoras de leite dos tipos A, B e C, localizadas na região de Jaboticabal, Estado de São Paulo, nas quais adotavam-se a ordenha mecânica, realizada duas vezes ao dia.

Fontes de abastecimento de água

As fontes de abastecimento de água disponíveis nas propriedades objeto desta investigação eram constituídas por 5 poços artesanais ou semi-artesianos, 3 minas, 1 poço raso e 1 córrego. A captação da água era realizada através de bombas de sucção, sendo o armazenamento efetuado em reservatórios aéreos e a distribuição realizada por canalização subterrânea até os diferentes pontos de utilização.

Amostras de água

Durante o período de setembro de 1993 a junho de 1994, colhia-se, mensalmente, de acordo com a técnica preconizada pela APHA (1985), uma amostra da água utilizada na higienização dos animais, equipamentos e utensílios de ordenha em cada propriedade rural, de modo a totalizar 100 amostras.

As referidas amostras foram obtidas diretamente das mangueiras com água sob pressão existentes na sala de ordenha e, após o acondicionamento em caixa de material isotérmico ("isopor"), contendo cubos de gelo, eram imediatamente transportadas para os laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal, onde realizavam-se as análises microbiológicas.

Análises microbiológicas

As amostras foram submetidas às contagens de coliformes totais, coliformes fecais (APHA 1985), microrganismos mesófilos (APHA 1985), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* (Lechevallier & Seidler 1980) e de *Escherichia coli* (APHA 1985).

As contagens de coliformes totais e de coliformes fecais foram realizadas a partir de volumes de 100 ml, 50 ml e de 10 ml de cada amostra de água, filtrados através do emprêgo de aparelho contendo membranas filtrantes com porosidade de 0,45µm.

Coliformes totais

Após a realização do processo de filtração, as membranas eram transferidas para a superfície das placas de Petri contendo Ágar M-Endo Less, as quais eram incubadas a 35°C por 24 horas em atmosfera cuja umidade relativa situava-se em torno de 90%.

A quantificação das colônias foi efetuada em aparelho apropriado, sendo contadas as colônias cuja coloração variava do rosa ao vermelho escuro, acompanhadas de brilho verde metálico dourado. Em seguida, pelo menos 5 colônias isoladas de cada amostra eram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo lactosado (CL) e caldo lactosado bile verde brilhante 2% (CLBVB).

Após a incubação a 35°C por 48 horas, eram confirmadas como pertencentes ao grupo dos coliformes as colônias que apresentavam a produção de gás nos tubos de ensaio contendo CLBVB. Caso houvesse a produção de gás apenas em CL, alíquotas desta cultura eram novamente transferidas para CLBVB e incubadas a 35°C por 48 horas.

Coliformes fecais

Após a realização do processo de filtração das amostras, as membranas eram transferidas para placas de Petri contendo Ágar M-FC, as quais eram acondicionadas em sacos plásticos herméticamente fechados, sendo em seguida incubadas em banho maria a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Decorrido este espaço de tempo, através da utilização de aparelho apropriado, efetuava-se a quantificação das colônias que apresentavam coloração azul.

Microrganismos mesófilos

Para a realização da contagem de microrganismos mesófilos, 1,0 ml da amostra e de suas diluições decimais eram depositados, em duplicata, em placas de Petri esterilizadas, aos quais adicionavam-se cerca de 15 ml de Ágar padrão previamente fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C. Após a homogeneização e solidificação em temperatura ambiente, as placas eram incubadas a 37°C por 48 horas.

As contagens foram realizadas em aparelho apropriado, sendo selecionadas as placas que apresentavam entre 30 e 300 colônias. A média do número de colônias contadas nas placas em duplicata, multiplicada pelo fator de diluição correspondente e por 100, expressava o número de microrganismos mesófilos por 100 ml da amostra.

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus coagulase negativa*

Para a realização das contagens destes microrganismos, foram filtrados 100 ml da amostra de água em aparelho contendo membrana com porosidade de 0,45µm. Após a filtração as membranas eram transferidas para a superfície de placas de Petri contendo Ágar *Staphylococcus* 110 e incubadas a 35°C por 48 horas. Decorrido este espaço de tempo, as colônias isoladas foram semeadas em ágar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas.

Após a incubação foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, sendo as cepas que apresentavam cocos Gram positivos dispostos sob a forma de cachos de uva, submetidas à identificação bioquímica, através das provas da coagulase, termonuclease, produção de catalase e acetoina, utilização em aerobiose da maltose e trealose e do manitol em aerobiose e anaerobiose, e a prova de oxidação e fermentação da glicose (MacFadin 1976).

Escherichia coli

A contagem de *E. coli* era realizada a partir das colônias características de coliformes fecais isoladas no Ágar M-FC. Assim sendo, semeavam-se entre 3 e 5 colônias em placas de Petri contendo Ágar eosina-azul de metileno e incubava-se a 35°C por 24 horas. Após a incubação, procedia-se o isolamento de colônias

negras, secas, chatas e com brilho metálico, as quais eram semeadas em Ágar nutriente inclinado.

Após a incubação a 35°C por 24 horas, preparava-se esfregaço corado pelo método de Gram, com a finalidade de verificar a morfologia bacteriana, representada pela presença de bastonetes Gram negativos, os quais eram submetidos às provas bioquímicas caracterizadas pelo indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e do aproveitamento do citrato, sendo, portanto, caracterizadas como *E. coli* as cepas que apresentavam resultados $\pm + - -$, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 mostra os valores médios das contagens de coliformes totais, coliformes fecais e de microrganismos mesófilos nas amostras de água das propriedades leiteiras investigadas na região de Jaboticabal, SP. Observa-se que os valores médio das contagens de coliformes totais, coliformes fecais e de microrganismos mesófilos variaram de zero a 3.695/100 ml, zero a 167/100 ml e de 1.370 a 783.900/100 ml, respectivamente.

A análise dos dados constantes desse Quadro revela que apenas as amostras de água obtidas em uma única propriedade leiteira apresentou características bacteriológicas próximas àquelas estabelecidas para a água potável. Apesar de não existir padrões específicos para a água empregada no procesos de obtenção do leite, Robinson (1987) afirma ser necessário que este produto apresente características bacteriológicas semelhantes às da água potável.

Quadro 1. Valores médios das contagens de coliformes totais coliformes fecais e de microrganismos mesófilos nas amostras de água das propriedades leiteiras da região de Jaboticabal, SP, 1994

Propriedades	Coliformes totais (ufc/100ml)	Coliformes fecais (ufc/100ml)	Microrganismos mesófilos (ufc/100ml)
A	39,0	2,6	631.000,0
B	0,0	0,0	1.370,0
C	3.695,0	154,0	783.900,0
D	2.388,0	39,7	29.000,0
E	88,8	7,2	28.600,0
F	276,0	130,0	23.300,0
G	6,8	0,1	9.420,0
H	344,0	167,4	54.000,0
I	347,0	25,1	37.330,0
J	301,0	80,0	50.000,0

A este respeito, o Ministério da Saúde (1990), através da Portaria nº 36 de 19/01/1990, estabelece que a água potável deve apresentar ausência de coliformes fecais em 100 ml da amostra. Com relação aos coliformes totais, para a água sem tratamento, a referida Portaria determina que 98% das amostras analisadas deverão apresentar ausência de coliformes totais em 100 ml e, nos 2% restantes, serão tolerados até 3 coliformes totais por 100 ml das amostras. A Portaria supra citada estabelece, ainda, que o número de microrganismos mesófilos não deve exceder a 500 ufc/ml.

Através dos resultados obtidos nas contagens dos referidos microrganismos indicadores, pode-se afirmar que a água oriundo dos lençóis subterrâneos de 9 (90,0%) propriedades leiteiras objeto desta investigação, apresentava precária qualidade higiênico-sanitária.

Helmer (1975) afirma que contaminação da água pode ocorrer nas fontes de captação, nos reservatórios e/ou nas redes de distribuição. Sabe-se, também, que nas propriedades rurais geralmente ocorre a disposição inadequada de resíduos orgânicos oriundo das atividades humana e animal, fato este que propicia maior oportunidade de contaminação da água, especialmente nas fontes de captação e nas redes de distribuição.

O Quadro 2 mostra os valores médios das contagens de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e de *Escherichia coli* nas amostras de água das propriedades leiteiras investigadas na região de Jaboticabal, SP. Verifica-se que os valores médios das contagens de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e de *E. coli* variaram de zero a 16,6/100 ml, 0,2 a 124,0/100 ml e de zero a 87,3/100 ml, respectivamente.

Quadro 2. Valores médios das contagens de *S. aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e de *E. coli* nas amostras de água das propriedades leiteiras da região de Jaboticabal, SP, 1994

Propriedades	<i>S. aureus</i> (ufc/100ml)	<i>Staphylococcus</i> coagulase (-) (ufc/10ml)	<i>E. coli</i> (ufc/100ml)
A	0,8	16,6	1,2
B	0,9	0,2	0,0
C	16,6	124,0	13,3
D	0,0	52,8	5,9
E	0,0	2,8	1,1
F	0,0	102,0	87,3
G	0,0	2,6	0,0
H	0,0	19,9	0,0
I	0,0	13,0	13,3
J	0,0	15,7	58,8

A análise dos dados constantes do Quadro 2 revela que nas amostras de água oriundo das propriedades estudadas isolou-se pelo menos um dos microrganismos investigados. Tais achados são preocupantes, uma vez que os referidos microrganismos constituem-se em importantes agentes etiológicos da mastite.

Tais achados além de corroborarem com a afirmação de Schukken et al. (1991), sugerem, também, que a água oriundo de lençóis subterrâneos empregada no processo de obtenção do leite pode representar importante risco potencial tanto para a qualidade microbiológica do leite como para o estado sanitário da glândula mamária.

Agradecimentos.- Aos médicos veterinários Omar Garcia e Luiz Roberto Amâncio, da Cooperativa de Plantadores de Cana da Zona de Guariba (COPLANA), pelo valioso auxílio oferecido por ocasião da colheita de amostras de água.

REFERÊNCIAS

- American Public Health Association 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th ed. New York. 423p.
- Filip A., Kaddu-Malindwad D. & Mild G. 1988. Survival and adhesion of some pathogenic and facultative pathogenic microorganisms in groundwater. Water Sci. Tech. 19:1189.
- Galton D.M., Adkinson R.W., Thomas C.V. & Smith T.W. 1982. Effects of premilking udder preparation on environmental bacterial contamination of milk. J. Dairy Sci. 65:1540-1543.
- Helmer R. 1975. La lucha contra la contaminacion del agua. Cron. OMS 29:465-472.
- Lechevallier M.S. & Seidler R.J. 1980. *Staphylococcus aureus* in rural drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 30(4):739-742.
- MacFadin J.F. 1976. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. William & Wilkins, Baltimore. 312p.
- Ministério da Saúde 1990. Normas e padrões de potabilidade da água para consumo humano. Diário Oficial da União, p. 1650-1654.
- Robinson R.K. 1987. Microbiologia Lactologica - Microbiología de la Leche. Acriba, Zaragoza (España). 230p.
- Schukken Y.H., Grommer F.J., Van De Greer D., Erb H.N. & Brand A. 1991. Risk factors for clinical mastitis in herds with low bulk milk somatic cell count. 2. Risk factors for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 74:826-832.