

## ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS EM LEITE CRU BOVINO COM A UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA TRADICIONAL E DO SISTEMA COMPACT DRY®

### Psychrotrophics bacteria counting in bovine raw milk using standard method and Compact Dry® system

Sabrina N. Casarotti<sup>1</sup>  
Aline T. de Paula<sup>1</sup>  
Aline Z. de Grandi<sup>1</sup>  
Daise A. Rossi<sup>2\*</sup>

#### RESUMO

A granelização do leite contribuiu para a diminuição das contagens de bactérias mesófilas no mesmo. Todavia, microrganismos com capacidade de sobreviver em baixas temperaturas, como as bactérias psicrotróficas, passaram a ganhar importância. Estes microrganismos propiciam modificações nos produtos lácteos, interferindo nas suas características sensoriais e reológicas e diminuindo a vida de prateleira. O presente trabalho possuiu como objetivo quantificar microrganismos psicrotróficos em 19 amostras de leite cru provenientes de uma usina beneficiadora da cidade de Uberlândia – MG e analisar a aplicabilidade do método alternativo Compact Dry® TC na enumeração destes microrganismos. Das 19 amostras coletadas, 18 (94,7%) apresentaram contagem maior ou igual a  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> e somente em 1 (5,3%) amostra a contagem foi inferior a  $1,0 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, para ambos os métodos. Os resultados evidenciam a necessidade de melhoria nas condições higiênico-sanitárias do manejo e armazenamento desta matéria-prima. A correlação entre os resultados obtidos nos dois métodos de análises utilizados foi positiva e significativa ( $r^2 > 0,9$ ). Esse coeficiente indica que os dois métodos são equivalentes, e que o Compact Dry® representa uma alternativa para análise de bactérias psicrotróficas.

**Termos para indexação:** leite cru, bactérias psicrotróficas, Compact Dry® TC, qualidade microbiológica.

#### 1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nutrientes no leite, sua alta atividade de água e o pH próximo da neutralidade torna-o meio favorável ao crescimento bacteriano (ARCURI et al., 2006; GERMANO; GERMANO, 2003; COX, 1993). Essas bactérias podem provocar alterações físico-químicas e sensoriais no produto, tornando-o inaceitável para o consumo ou transformando-o em um alimento veiculador de doenças (NASCIMENTO et al., 1991).

Visando a melhoria da qualidade do leite, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu novas regras pela Instrução Normativa 51 (IN 51), que estabeleceu a

obrigatoriedade do sistema de refrigeração do leite cru e da granelização no transporte em nível de propriedades leiteiras (NERO et al., 2005; RIBEIRO-FURTINI, 2005; FAGUNDES et al., 2006; AMORIM, 2007). A granelização trouxe uma redução significativa nas contagens de bactérias mesófilas e, consequentemente, diminuiu drasticamente as condenações de leite por alta acidez. Porém, outros grupos de microrganismos com capacidade de se multiplicar em baixas temperaturas, como os psicrotróficos, passaram a ganhar importância (NADER et al., 2003).

No leite cru recém-ordenhado produzido sob condições normais de higiene representa em torno de 10% da microbiota total (PINTO et al., 2006). Entretanto, em leite mantido sob refrigeração, essas bactérias têm predominância sobre as demais

1 Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos. Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil.

2 Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária. Av. Ceará. s/n - B1 2D, sala 43, 38405-303 Uberlândia, MG, Brasil. E-mail: daiser@umuarara.ufu.br

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

espécies presentes, tanto no leite cru quanto no leite beneficiado, chegando a constituir mais de 75% da população total (DESMASURES; GUEGUEN, 1997; MUIR, 1996; COUSIN, 1982).

As principais fontes de contaminação do leite e derivados com bactérias psicrotróficas são os utensílios e equipamentos utilizados no manuseio do leite nas fazendas e a higiene inadequada na ordenha (ENEROTH et al., 1998; MURPHY; BOOR, 2000). A manutenção do leite refrigerado por tempo prolongado, nas fazendas e usinas de beneficiamento facilita a proliferação deste grupo (FAGUNDES et al., 2006; ALVIM, 1992). A legislação brasileira, na IN 51, não estabelece parâmetros em relação à contagem de bactérias psicrotróficas em leite cru. Entretanto, com base em estudos já realizados, é imprudente a fabricação de produtos a partir do leite cru com contagem de bactérias psicrotróficas superior a  $5,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (RYSER, 1999; THOMAS; THOMAS, 1973).

Bactérias psicrotróficas são importantes deteriorantes de leite e derivados. Estes microrganismos produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes (GRIFFITHS et al., 1981) que agem sobre os componentes lácteos e alteram as características físico-químicas e organolépticas, além de diminuir a vida de prateleira do leite e dos seus derivados (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; CHEN et al., 2003; COX, 1993; CROMIE, 1992; PEREIRA et al., 2001). Dentre os principais problemas decorrentes dos altos números de bactérias psicrotróficas podem ser destacados: geleificação do leite UHT, modificações consistência e textura, sabores e odores desagradáveis nos produtos lácteos durante a estocagem e maturação, rancificação e diminuição no rendimento industrial na produção de queijos e redução da vida de prateleira dos produtos (ORDONEZ, 2007; ALMEIDA, 1998).

Uma forma que as indústrias encontraram para minimizar as perdas tecnológicas decorrentes dos altos números de psicrotróficos no leite foi o seu monitoramento por meio de análises (SILVA, 2001; GARCIA et al., 2000). O método tradicional de cultivo em placas recomendado para contagem de psicrotróficas no leite e seus derivados pelo Standard Methods for the Examination of Dairy Products (FRANK; YOUSEF, 2004) preconiza a incubação das placas por 10 dias a 7°C. O volume das placas e o grande tempo de incubação dificultam a análise do número de análises necessárias pelas indústrias.

Nos últimos anos várias metodologias de análises alternativas têm sido oferecidas às indústrias de alimentos. De forma geral são consideradas mais rápidas e mais práticas que a metodologia convencional, sem comprometer a sensibilidade e exatidão (FRANCO, 1994; CASAROTTI et al., 2007). Um destes métodos é o Compact Dry®, que contém enzimas cromogênicas capazes de detectar

atividades de enzimas características dos microrganismos pesquisados (BARANCELLI et al., 2004). O Compact Dry® TC utilizado para contagem de bactérias totais possui validações da A.O.A.C. n°. 010404 (2008), NordVal n°. 033 (2008) e MicroVal n° MV0703-001LR (2007).

KODAKA et al. (2006b) compararam as técnicas do número mais provável (NMP) e Compact dry CF para a enumeração de coliformes em cinco diferentes tipos de carnes. Para cada uma das carnes foram avaliados quatro níveis de contaminação diferentes com cinco repetições de cada, totalizando 20 amostras por matriz cárnea. O resultado demonstrou que não havia diferença significativa entre os resultados dos dois métodos. MELDRUM (2004) reportou os dados obtidos no estudo de validação realizados pela AOAC entre o Compact dry TC e o método oficial para enumeração de bactérias mesófilas e considerou os métodos equivalentes. Foram analisadas amostras de carne moída em três diferentes níveis de contaminação ( $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$ ) com cinco repetições de cada, em um total de 15 amostras para cada tipo de matriz. Nestes estudos foi calculado o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para realizar a comparação entre os métodos.

O objetivo desse estudo foi avaliar a presença de bactérias psicrotróficas em leite cru bovino refrigerado e analisar a aplicabilidade do método alternativo Compact Dry® TC na enumeração destes microrganismos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e preparo das amostras

Foram coletadas 19 amostras de 600 mL de leite cru diretamente do balão isotérmico em uma usina beneficiadora. As amostras foram acondicionadas em recipiente estéril, e transportadas em caixa isotérmica para o Laboratório de Biotecnologia Animal da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/UFU), onde foram imediatamente analisadas. No laboratório, as amostras receberam um número de identificação e suas embalagens foram higienizadas externamente com álcool etílico 70%, levadas para fluxo laminar e abertas asépticamente. Em seguida, realizaram-se as diluições decimais seriadas em 9mL de água peptonada 0,1%.

### 2.2 Contagem de psicrotróficas pelo método tradicional e pelo sistema Compact Dry®

A contagem de bactérias psicrotróficas foi realizada em paralelo pela técnica de análise convencional e pelo teste rápido Compact Dry®. Como metodologia convencional foi utilizada a contagem em placas no ágar padrão para contagem (PCA) (SILVA et al., 2007). As placas de Compact

Dry® TC (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) foram inoculadas com 1 mL das diluições selecionadas, conforme recomendação do fabricante. As placas de ambos os métodos foram incubadas a 7°C por dez dias. Ao final do período de incubação as colônias foram contadas e o total foi multiplicado pela recíproca da diluição utilizada. O resultado foi expresso como UFC.mL<sup>-1</sup>.

### 2.3 Análise dos resultados

Os resultados obtidos nas contagens foram transformados em logaritmo de base 10 ( $\log_{10}$ ). Utilizou-se análise de regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para a comparação dos resultados obtidos nos diferentes métodos. Na análise estatística foram utilizados os critérios tradicionais de equivalência entre dois métodos que são: coeficiente angular próximo de 1,0, coeficiente linear próximo de 0,0 e coeficiente de correlação >0,9 (FONSECA; MARTINS, 1993).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 19 amostras analisadas 94,7% (18/19) apresentaram contagens maiores ou iguais a 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para ambos os métodos. As contagens variaram de 4,0 x 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> a 2,8 x 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para o sistema Compact Dry®, e 2,0 x 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> a 9,7 x 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para o método tradicional, sendo que somente uma amostra (5,3%) não apresentou contagem inferior a 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (Tabela 1).

No presente estudo foi encontrada 1/19 (5,3%) amostra com valor menor que 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, em ambos os métodos utilizados; 4/19 (21,1%) e 1/19 (5,3%) amostras com valores de 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para o método Compact Dry® e o método tradicional, respectivamente; 9/19 (47,3%) amostras com contagens de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para ambos os métodos; e 5/19 (26,3%) e 8/19 (42,1%) amostras apresentaram valores superiores a 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para o método Compact Dry® e o método tradicional, respectivamente (Tabela 2).

Neste estudo 73,6% das amostras analisadas tiveram contagens superiores a 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Não existe padrão pré-estabelecido para contagem máxima aceitável de bactérias psicrotóficas em leite cru na IN 51 (BRASIL, 2002). Provavelmente, a falta de padrão para esse grupo é devido ao fato de serem deteriorantes e não patogênicas. Porém, THOMAS & THOMAS (1973) recomendam como satisfatória uma contagem inicial inferior a 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no leite refrigerado a granel. Estes autores consideram contagens iniciais entre 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> como indicativas da necessidade de melhoria nas condições de higiene da ordenha e/ou limpeza e esterilização dos equipamentos e quando superior a 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> uma indicação definitiva de condições insatisfatórias de produção ou refrigeração e estocagem ineficiente do leite na propriedade.

Estes resultados sugerem que os procedimentos de higienização, tempo e temperatura de estocagem da matéria-prima na fonte produtora e as condições de transporte não foram adequados para prevenir a

**Tabela 1** – Bactérias psicrotóficas (UFC.mL<sup>-1</sup>) em 19 amostras de leite cru refrigerado coletadas em uma usina beneficiadora.

Amostras	Compact Dry	Tradicional	Amostras	Compact Dry	Tradicional
1	7,3 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>	11	4,0 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>
2	8,1 x 10 <sup>6</sup>	2,9 x 10 <sup>6</sup>	12	6,6 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>
3	4,6 x 10 <sup>6</sup>	2,8 x 10 <sup>6</sup>	13	1,2 x 10 <sup>7</sup>	2,3 x 10 <sup>7</sup>
4	5,0 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	14	4,6 x 10 <sup>6</sup>	1,6 x 10 <sup>7</sup>
5	1,0 x 10 <sup>6</sup>	1,8 x 10 <sup>6</sup>	15	1,0 x 10 <sup>7</sup>	2,6 x 10 <sup>7</sup>
6	1,0 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	16	4,4 x 10 <sup>6</sup>	8,4 x 10 <sup>6</sup>
7	8,0 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>6</sup>	17	2,8 x 10 <sup>7</sup>	9,7 x 10 <sup>7</sup>
8	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>4</sup>	18	2,6 x 10 <sup>6</sup>	5,4 x 10 <sup>6</sup>
9	1,5 x 10 <sup>7</sup>	6,8 x 10 <sup>7</sup>	19	1,7 x 10 <sup>7</sup>	4,1 x 10 <sup>7</sup>
10	1,9 x 10 <sup>6</sup>	5,0 x 10 <sup>6</sup>			

**Tabela 2** – Percentual de amostras de leite cru agrupadas por intervalos de contagem de bactérias psicrotóficas (UFC.mL<sup>-1</sup>) nos métodos tradicional e Compact Dry®.

Intervalo de contagem (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Método de análise (n°) / %	
	Compact Dry	Tradicional
< 1,0 x 10 <sup>4</sup>	(1) 5,3%	(1) 5,3%
1,0 x 10 <sup>4</sup> ? 10 <sup>5</sup>	(4) 21,1%	(1) 5,3%
10 <sup>5</sup> ? 10 <sup>6</sup>	(9) 47,3%	(9) 47,3%
10 <sup>6</sup> ? 10 <sup>7</sup>	(5) 26,3%	(8) 42,1%

presença ou inibir o crescimento das bactérias psicrotróficas. É provável também que estas contagens sejam causa de problemas tecnológicos.

Altas contagens de bactérias psicrotróficas também foram encontradas em leite cru refrigerado armazenado em tanque horizontal isotérmico a aproximadamente 11° C, na cidade de Goiânia. As contagens dos microrganismos psicrotróficos variaram de  $1,99 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $6,29 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> (AMORIM, 2007). Contagens semelhantes também foram verificadas em leite cru transportado em caminhões isotérmicos em sete municípios do Sudoeste da Bahia. Os valores apresentados variaram entre menor que  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $3,6 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (FERRÃO; CARDOSO, 2003).

A análise microbiológica do leite cru em amostras provenientes de tanques de refrigeração individual, coletivos e do silo de uma indústria processadora de leite localizada na Zona da Mata Mineira, demonstrou resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. A contagem de bactérias psicrotróficas nestas amostras variaram entre  $2,0 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $1,0 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> nos tanques individuais, entre  $8,90 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $3,2 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> nos tanques coletivos e entre  $5,6 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $6,4 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> nas amostras coletadas no silo industrial (PINTO et al., 2006).

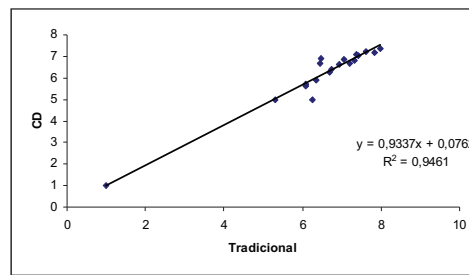
Contagens de psicrotróficas superiores a  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram verificadas em 90% das amostras de leite cru coletadas individualmente em tanques de expansão (SANTOS; FONSECA, 2001). Análises realizadas em leite cru provenientes de diferentes regiões do Rio Grande do Sul mostraram que 16,66% das amostras possuíam contagens entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>; e 83,34% possuíam contagens acima de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Estas contagens demonstram altos níveis de contaminação do leite cru e, provavelmente, problemas tecnológicos resultantes da sua utilização na indústria (SCHIMTT et al., 2003).

Fagundes e colaboradores (2006) compararam a qualidade de leites provenientes de propriedades leiteiras com distintos manejos sanitários e nos leites cru recém-obtido e refrigerado. Nas propriedades com higiene inadequada, a contagem de psicrotróficas foi de  $1,08 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> no leite recém-obtido, e de  $1,6 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> no leite cru refrigerado. Nas propriedades com condições de higiene adequadas, as contagens de psicrotróficas encontradas foram  $7,33 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, para o leite recém-obtido, e  $1,02 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> para o leite cru refrigerado.

Existe uma grande controvérsia entre a relação do número de bactérias contaminantes e os possíveis defeitos na qualidade do leite e derivados após o processamento. ADAMS et al. (1975) observaram que altas contagens de psicrotróficas não são necessárias para a produção

de concentrações significativas de proteases termorresistentes. KOCAK & ZADOW (1985), ao estudarem o efeito do número de bactérias psicrotróficas sobre a geleificação em leite UHT integral, estocado a 25 °C, e a extensão da proteólise, também constataram que amostras de leite UHT processadas com contagem bacteriana alta e baixa geleificaram na mesma proporção. Os autores concluíram que o tempo de geleificação não pareceu estar associado somente com a qualidade microbiológica do leite.

O coeficiente de correlação entre os métodos de análise avaliados foi positivo e significativo ( $r^2=0,9461$ ), indicando que os dois métodos são equivalentes. A representação gráfica com o coeficiente de correlação e a equação da reta entre os diferentes métodos pode ser observada na Figura 1.



**Figura 1** – Regressão linear das contagens de psicrotróficas obtidas em Compact Dry® TC e no método tradicional em 19 amostras de leite cru refrigerado.

O resultado obtido neste estudo foi semelhante a outras comparações que demonstraram coeficientes de correlação positivos e significativos entre a metodologia tradicional e o Compact Dry®, para diversos tipos de microrganismos (KODAKA et al., 2006a; BEUCHAT et al., 1998; CASAROTTI et al., 2007), indicando que o Compact Dry® representa uma alternativa confiável para análise de psicrotróficas no leite cru. O método alternativo analisado demonstrou também ser de prática execução e fácil manipulação e comprovou ser mais uma opção na análise de psicrotróficas nas indústrias de laticínios.

#### 4 CONCLUSÃO

Apesar da legislação brasileira não estabelecer padrões relacionados às bactérias psicrotróficas em leite cru, os resultados evidenciam a necessidade de melhoria nas condições higiênico-sanitárias do manejo e armazenamento desta matéria-prima. Portanto, há necessidade de investimentos contínuos em boas práticas para prevenção da contaminação e do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite para reduzir problemas tecnológicos e

econômicos na indústria de laticínios. O sistema Compact Dry® mostrou-se equivalente ao método tradicional de contagem de psicotróficas por apresentar coeficiente de correlação positivo e significativo ( $r^2=0,9461$ ), podendo ser adotado desta forma, para análises de rotina da indústria.

#### ABSTRACT

The bulk milk has resulted in the reduction of the countings of mesophilic bacteria in milk. However, microorganisms that survive in low temperatures as the psychrotrophic bacteria became more relevant. These microorganisms are responsible for modifications in the milky products, intervening with its sensorial and rheological characteristics and reducing the shelf life. The aim of this study was to count psychrotrophic microorganisms in bovine raw milk and analyze the performance of Compact Dry® for counting these microorganisms. From the analyzed samples, 18 (94.7%) showed equal or higher countings than  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> and in 1 (5.2%) sample, the number of psychrotrophics was inferior to  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, for both methods. According to these results it is necessary to improve the sanitary quality of raw milk. Simple regression analysis of data showed a strong correlation between standard method and Compact Dry® ( $r^2>0.9$ ) for determining the number of psychrotrophics, which suggests that Compact Dry® is suitable to be employed as alternative technique for microorganisms counting in raw milk.

**Index terms:** raw milk, psychrotrophics, Compact Dry®, microbiological quality.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 10, p. 828-835, 1975.
- ALMEIDA, A. A. Microorganismos psicotróficos em leite e derivados. Juiz de Fora: *Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios*, v. 53, n. 304, p. 40-43, 1998.
- ALVIM, T. C. **Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho. Filtração gélida (GF-HPLC)**. 1992, 63 pp. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- AMORIM, H. E. **Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP (Caseinmacropeptídeo)** 2007, 59 pp. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás (UFG).
- A.O.A.C. Research Institute. **Certificate of Performance Tested<sup>SM</sup> Status** (Certificate no. 010404) - Nissui Compact Dry Total Count, Washington, 2008.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica de leite refrigerado nas fazendas. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- BARANCELLI, G. V.; SARKIS, F.; GALLO, C. R.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação de métodos para enumeração de microrganismos aeróbios mesofílicos e coliformes em leite cru. *Revista Higiene Alimentar*, v. 18, n. 120, p. 70-84, 2004.
- BEUCHAT, L. R. Spoilage of acid products by heat-resistant molds. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v.18, n 9, p.588-593, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002.
- CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 3, p. 278-286, 2007.
- CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic micro-organisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.
- COX, J. M. The significance of the psychrotrophic pseudomonads in dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 48, n. 2, p. 108-112, 1993.
- CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzymes

- reduces in cheese milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 96-100, 1992.
- DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **Journal of Dairy Research**, v.64, p. 271-280, 1997.
- ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 9, p. 829-834, 1998.
- FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.
- FERRÃO, S. P. B.; CARDOSO, I. P. N. Contagem de microrganismos psicotróficos em leite cru coletado a granel de diferentes municípios do Sudoeste da Bahia. **Revista do Instituto de Laticínios de Cândido Tostes**, v. 58, n. 333, p. 248-250, 2003.
- FONSECA, J. S.; MARTINS, G. A. **Curso de Estatística**. São Paulo: Atlas, 1993.
- FRANCO, B. D. M. G. **Métodos rápidos de análises microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias**. 1994, 128 pp. Tese (Livre-docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo (USP).
- FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Tests for groups of microorganisms. In: WHER, H. M.; FRANK, J. F. (eds), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2004. Chapter 8, p. 227-248.
- GARCIA, C. A.; SILVA, N. R. D. A.; LUQUETTI, B. C.; MARTINS, I. P.; SILVA, R. T. D. A.; VIEIRA, R. C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite "in natura". **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 70, p. 39-50, 2000.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos / Hygiene and health surveillance of foods**. São Paulo: Varela, 2003.
- GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Ther-mostability of proteases and lipases from a number of species of psychotrophic bacteria of dairy origin. **Journal Applied Bacteriology**, v. 50, p. 289-303, 1981.
- KOCAK, H. R.; ZADOW, J. G. Age gelation of UHT whole milk as influenced by storage temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 40, n. 1, p.14-21, 1985.
- KODAKA, H.; MIZUOCHI, S.; TERAMURA, H.; NIRAZUKA, T.; ODA, S.; TANAKA, H.; RICHTER, E. R.; BETTS, R. Comparison of the Compact Dry YM with the FDA BAM Method for Enumeration of Yeasts and Molds in Fruit-Based Products: *Performance-Tested Method<sup>SM</sup>* 100401. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p. 127-138, 2006a.
- KODAKA, H.; TERAMURA, H.; NIRAZUKA, T.; MIZUOCHI, S. Comparison of the Compact Dry CF with the Most Probable Number Method (AOAC Official Method 966.24) for the enumeration of coliform bacteria in raw meats. *Performance-Tested Method<sup>SM</sup>* 110401. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p. 115-126, 2006b.
- MELDRUM, R. Report by the National Public Health Service for Wales for the AOAC Research Institute on the NISSUI Compact Dry Total Count method. **National Public Health Service for Wales**, Penarth, p. 1-9, 2004.
- MICROVAL. **Compact Dry TC complies with de MicroVal Rules and Certification Scheme version 5**. Certificate no MV0703-001LR, Rotterdam, p. 1-4, 2007.
- MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: factors influencing raw and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, p. 24-32, 1996.
- MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 20, n. 8, p. 606 611, 2000.
- NADER, T. T.; GARCIA, C. A.; MIRANDA, F. A.; BARROS, J. J. C.; ROSSI, D. A. Eficiência da ozonização na redução de *Pseudomonas fluorescens* inoculadas em leite cru. Florianópolis: **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2003 (CD.).
- NASCIMENTO, G. G. F.; FIGUEIREDO, S. H. M.; UBISSES, D. M.; ANTONELLI, E. M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado

- em Piracicaba-SP. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p.13-21, 1991.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.
- NORDVAL. **Compact Dry TC Method fo the enumeration of total viable organisms**. NordVal no 033, Oslo, Norway, p. 1-5, 2008.
- ORDONEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos – Origem Animal**. São Paulo: Artmed, 2007.
- PEREIRA JR., F. N.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; AMADO, J. E. S. Comparação de métodos utilizados para enumeração de microrganismos psicrotróficos em leite cru. Juiz de Fora: **Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios**, v. 56, n. 321, p. 334-339, 2001.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- RIBEIRO-FURTINI, L. L. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência**. 2005, 80 pp. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos). Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA).
- RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v. 8, p. 7-9, 1999.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.
- SCHMITT, A.; DÜRR, J.; W.; SOARES, J. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em microusinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 107, p. 100-105, 2003.
- SILVA, E. O. T. R. **Leite longa vida: avaliação de alguns parâmetros de qualidade dos leites cru e processado**. 2001, 130 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) Universidade de São Paulo (USP).
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 3.ed., São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-37, 1997.
- THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk – part 1. **Dairy Industries**, v. 38, n. 2, p. 61-70, 1973.