

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
LAYLA CAROLINA LEITE

**QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
PSICOTRÓFICOS EM LEITE CRU REFRIGERADO DE UM LATICÍNIO NA
REGIÃO DE PIUMHI-MG COMPARADOS AO LEITE CRU REFRIGERADO DE
BÚFALAS CAPTADO NO MESMO ESTABELECIMENTO**

FORMIGA – MG
2019

LAYLA CAROLINA LEITE

QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
PSICOTRÓFICOS EM LEITE CRU REFRIGERADO DE UM LATICÍNIO NA
REGIÃO DE PIUMHI-MG COMPARADOS AO LEITE CRU REFRIGERADO DE
BÚFALAS CAPTADO NO MESMO ESTABELECIMENTO

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Medicina Veterinária do UNIFOR-
MG, como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Leonardo Borges Acurcio

FORMIGA – MG
2019

Layla Carolina Leite

**QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
PSICROTRÓFICOS EM LEITE CRU REFRIGERADO DE UM LATICÍNIO NA
REGIÃO DE PIUMHI-MG COMPARADOS AO LEITE CRU REFRIGERADO DE
BÚFALAS CAPTADO NO MESMO ESTABELECIMENTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Medicina Veterinária do UNIFOR-
MG, como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Medicina Veterinária.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio
Orientador

Prof. Dr. José Barbosa Júnior
UNIFOR-MG

Prof. Dra. Telma da Mata Martins
UNIFOR-MG

Formiga, 09 de Julho de 2019

Dedico este trabalho aos meus pais Douglas e Valdete, em especial ao meu filho
Pietro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse e por ter me dado uma família tão especial.

Aos meus pais Douglas e Valdete, por todos os conselhos e a paciência que tiveram comigo nesse longo período. Obrigada pelo amor que sempre demonstraram, por torcer e vibrar com minhas conquistas, por não medir esforços para que eu conseguisse alcançar esse sonho. Vocês são o motivo de todo meu esforço. Jamais conseguirei retribuir tudo que fazem por mim.

A minha irmã Nayara e ao meu cunhado Jademir, por compartilharem os momentos mais felizes e também os mais difíceis da minha vida. Obrigada por toda ajuda, preocupação e conselhos.

Ao meu esposo Mateus, pela paciência e compreensão na correria de cada semestre, e que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Em especial ao meu filho Pietro, o qual tive que me ausentar do seu crescimento para que conseguisse concretizar esse sonho. Obrigada meu filho por sempre confiar na mamãe mesmo estando longe. Você é o motivo por nunca ter desistido do meu sonho, te amo!

Ao meu orientador Prof. Leonardo Borges Acurcio pelo suporte e disponibilidade em me ajudar a concretizar essa etapa. Obrigada pelos ensinamentos, atenção e incentivo.

A todos os professores pela constante disposição em contribuir para o aumento de nosso conhecimento.

Às estagiárias do laboratório, que sempre se prontificaram para que concluísse com êxito essa etapa. Obrigada meninas pelo carinho e amizade.

A minha amiga Emillyane, por toda ajuda ao longo deste trabalho, pelas conversas, pelo carinho e amizade.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para que conseguisse concluir esse trabalho, o meu muito obrigada.

RESUMO

A quantificação de bactérias psicotróficas presentes no leite cru está diretamente ligada à higienização na produção, à temperatura de armazenamento e ao período de estocagem. É desejável que o leite tenha uma contagem baixa de psicotróficos, uma vez que esses microrganismos possuem atividade metabólica, causando alterações bioquímicas nos constituintes, diminuindo o prazo de validade dos produtos lácteos. O objetivo deste trabalho foi quantificar os microrganismos psicotróficos, classificando a atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas em leite cru refrigerado e compará-los aos encontrados em leite cru refrigerado de búfalas. As amostras de leite cru refrigerado e de leite cru refrigerado de búfala, foram coletadas em tanques de expansão em um laticínio no município de Piumhi-MG, em duplicata, com uma repetição. Foram colocados 1ml de cada uma das diluições (até 10^{-4}) em placas de Petri, que foram cobertas com ágar *BHI* fundente. Logo após, seguiu-se com incubação a 37°C , por 48h. Nas amostras de leite cru, os valores da contagem de microrganismos totais encontrados foram de $1,63 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^2$ UFC/ml, enquanto a contagem encontrada no leite cru refrigerado de búfala foi de $7,7 \times 10^6 \pm 1,42 \times 10^6$ UFC/ml. A avaliação da atuação das enzimas lipolíticas foram feitas em ágar tributirina, e as proteolíticas, em ágar caseinato de cálcio. Logo após a contagem de microrganismos, as colônias que foram isoladas no crescimento em meio ágar *BHI*, foram caracterizadas conforme suas características morfológicas. A morfotintura feita por meio da coloração de Gram expressou que das dez colônias isoladas, seis eram Gram positivo (60%) e quatro eram Gram negativo (40%). Os resultados obtidos na segunda etapa mostraram baixas ocorrências de microrganismos com atuação proteolítica e não houve incidência de microrganismo com capacidade lipolítica. Nenhuma colônia obteve crescimento a 7°C . Não houve resultados expressivos nesse quesito, o que consiste em um aspecto favorável à utilização desse leite para o beneficiamento e produção de derivados.

Palavras-chave: Temperatura de armazenamento. Qualidade do leite. Segurança alimentar.

ABSTRACT

The quantification of psychrotrophic bacteria present in raw milk is directly linked to hygiene in production, storage temperature and storage period. It is desirable that the milk has a low psychrotrophic count, since these microorganisms have a metabolic activity causing biochemical changes in the constituents decreasing the shelf-life of dairy products. The objective of this work was to quantify the psychrotrophic microorganisms, classifying the presence and activity of the proteolytic and lipolytic enzymes in refrigerated raw milk and comparing them to those found in raw refrigerated milk of buffaloes. The samples of refrigerated raw milk and raw buffalo milk were collected in expansion tanks in a dairy in the municipality of Piumhi-MG, in sterile 80 ml bottles, the samples were collected in duplicate with one replicate. Homogenization of each sample was done, serially diluted in tubes containing 9 ml of sterile saline solution (0.9% NaCl) until dilution 10^{-4} . 1ml of each of the dilutions were placed in petri dishes which were then covered with fudent BHI (brain heart infusion, Himedia, Mumbai, India) agar. Subsequently, incubation was carried out at 37 ° C for 48h. In the raw milk samples, the total microorganism counts were $1,63 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^2$ CFU/mL, while the count found in buffalo raw milk was $7,7 \times 10^6 \pm 1,42 \times 10^6$ CFU / ml. The evaluation of the performance of the lipolytic enzymes was done in tributyrin agar and the proteolytic ones in casein calcium agar. Soon after the counting of microorganisms, the colonies that were isolated in the growth in BHI agar medium were characterized according to their morpho-typic characteristics. In the morphotinture made through Gram staining, one of the ten isolated colonies is Gram positive (60%) and four Gram negative (40%). The results obtained in the second stage showed low occurrences of microorganisms with proteolytic activity and there was no incidence of microorganism with lipolytic capacity at 37 ° C. No colony grew at 7 ° C.

Keyword: Storage temperature. Milk quality. Food safety.

LISTA DE QUADROS

Tabela 1 - Contagem (média±desvio padrão) de microrganismo totais a 37°C de leite cru refrigerado e leite cru refrigerado de búfala de um laticínio em Piumhi-MG	20
Tabela 2 - Caracterização morfológica das colônias isoladas em ágar BHI do leite cru refrigerado de um laticínio de Piumhi-MG.....	21
Tabela 3- Caracterização morfológica das colônias isoladas em ágar BHI do leite cru de búfala refrigerado de um laticínio de Piumhi-MG.....	21
Tabela 4- Morfologia e classificação morfotintorial dos microrganismos isolados de leite cru e leite cru de búfala de um laticínio de Piumhi-MG observadas em microscopia óptica após a coloração de Gram.....	22
Tabela 5 – Caracterização psicrotrofica (crescimento a 7°C por 7 dias) e quanto à atividade enzimática (proteólise e lipólise a 7° e a 37°C) dos microrganismos isolados de leite cru e leite cru de búfala de um laticínio de Piumhi-MG.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO₂ - Dióxido de carbono

H₂- Gás hidrogênio

UFC/ml - Unidade formadora de colônia por mililitro

UHT- Ultra High Temperature

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 CADEIA PRODUTIVA	12
2.2 LEITE	13
2.3 LEITE DE BÚFALA	13
2.4 MICROBIOTA DO LEITE	14
2.5 BACTÉRIAS PSICOTRÓFICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS	20
4.2 CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIAIS	21
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE PSICOTRÓFICOS, E DE SEU PERFIL PROTEOLÍTICO E LIPOLÍTICO.....	24
5 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma substância secretada pela glândula mamária de fêmeas de várias espécies de mamíferos, sendo considerado o principal alimento para os recém-nascidos, responsável pela sua nutrição. O leite produzido por vacas, búfalas, ovelhas, cabras e camelas também é usado para alimentação humana (ROBINSON, 2002), como fonte de cálcio, proteínas, gorduras e algumas vitaminas. Por ser rico em nutrientes e possuir uma microbiota natural, fica mais predisposto à deterioração, tornando indispensável uma boa higienização na sua obtenção, associado a uma temperatura adequada durante o seu armazenamento (TRONCO, 2003).

Mesmo que o leite seja submetido à refrigeração, pode sofrer deterioração rapidamente, tornando-se um substrato propício para proliferação de inúmeras bactérias. Algumas bactérias multiplicam rapidamente a sua população em 20 a 30 minutos. Sendo assim, o leite deve ser manipulado corretamente do início da ordenha até chegar à indústria de laticínios e ao consumidor final (GUERREIRO et al., 2005).

A quantidade de microrganismos no leite oscila e está relacionado com a carga inicial e a taxa de multiplicação de microrganismos. A quantidade de microrganismos inicial depende das condições da saúde do rebanho, da higienização da ordenha (desde a limpeza e a desinfecção da superfície dos tetos), do descarte dos primeiros jatos de leite e, finalmente, das condições de limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha (BALESTRINI; PASQUALOTTO, 2011).

Alguns dos microrganismos mesófilos presentes no leite cru conseguem se multiplicar em temperaturas baixas, pois estes conseguem se adaptar ao frio, ativando vias metabólicas proteolíticas e/ou lipolíticas neste processo (SANTANA et al., 2001). Dessa forma, um leite cru que passa por má higienização e/ou refrigeração inadequada terá reflexos negativos na qualidade do seu produto final. Mediante o exposto, este trabalho objetiva quantificar os microrganismos psicrófilos em leite cru refrigerado e compará-los aos encontrados em leite cru refrigerado de búfalas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CADEIA PRODUTIVA

A cadeia produtiva do leite segue o fluxograma, que corresponde desde sua obtenção (através da ordenha) até o consumidor final. Para obtermos um produto de qualidade, devemos ficar atentos a falhas de manejo que podem deteriorar o produto em qualquer fase do fluxograma.

A ordenha é a técnica usada para a retirada do leite produzido na glândula mamária. Quando esta técnica é realizada em condições apropriadas, proporciona a obtenção de um produto com melhor quantidade e qualidade (NETTO; BRITO; FIGUEIRÓ, 2006). Os procedimentos de higiene que antecedem a ordenha manual e mecânica das propriedades rurais precisam se adequar aos métodos descritos pelo Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade (BRASIL, 2018).

O objetivo da ordenha higiênica é a obtenção do leite com uma baixa carga bacteriana, certificando um produto com boa qualidade ao consumidor, e para a indústria láctea, uma matéria prima sem contaminação (PORTO, 1998).

Segundo Santos (2000), o crescimento dos microrganismos, principalmente as bactérias, são responsáveis pela alteração das características de qualidade do leite, como fermentação da lactose e degradação das proteínas e gorduras. O uso de tanque de expansão é a forma mais eficiente de resfriamento rápido do leite. De acordo com a Instrução Normativa nº77 o leite cru deverá ser refrigerado com temperatura igual ou inferior a 4°C no período máximo de três horas após o término da ordenha, e a temperatura deverá ser mantida até o momento da coleta (Brasil, 2018).

Após a coleta, o leite deve ser transportado em caminhão-tanque isotérmico e, no instante da recepção na indústria, a sua temperatura tem que ser menor que 7°C, para assegurar uma boa qualidade e garantir que um eficiente transporte foi realizado (PAULA; CARDOSO; RANGEL, 2010). O tempo entre as coletas de leite nas propriedades rurais não deve exceder a quarenta e oito horas (BRASIL, 2018).

2.2 Leite

A Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018 define que o leite cru é produzido em propriedades rurais, refrigerado e coletado a fim de ser transportado para um estabelecimento de leite e derivados. Algumas características sensoriais devem estar presentes no leite cru refrigerado, como, ser um líquido branco opalescente homogêneo e com odor característico (BRASIL, 2018). O leite de outros animais deve ser classificado de acordo com a espécie de que procede (BRASIL, 2018).

Conforme Souza (2006), além da importância econômica, o leite é tido como um alimento quase completo para o ser humano, visto que sua composição é rica em proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos e minerais, sobretudo o cálcio, com indicação para qualquer faixa etária. Pereda et al. (2005), pontuam que o leite é uma mistura homogênea com diversas substâncias (lactose, glicérides, proteína, sais, vitaminas, enzimas, etc.) onde algumas se encontram em emulsão (gordura e substâncias associadas), outras em suspensão (caseínas e alguns sais minerais como o cálcio), e algumas em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, demais sais minerais, etc.).

Segundo Ferreira (2007), alguns fatores podem influenciar na composição do leite, mas o componente encontrado em maior porção é a água, sendo responsável por 87%, seguida por lactose (4,9%), gordura (3,9%), proteínas (3,5%) e sais minerais (0,7%).

Além do valor nutritivo, o leite contém, em sua forma natural, uma ampla microbiota, que pode variar de acordo com a saúde do úbere do animal ordenhado e com as condições de armazenamento do leite obtido (PAULA; CARDOSO; RABGEL, 2010).

2.3 Leite de búfala

O leite de búfala apresenta características típicas que permitem sua fácil identificação sob o ponto de vista físico-químico e sensorial. Apresenta sabor ligeiramente adocicado, coloração mais branca que do leite bovino, devido à ausência quase total de caroteno em sua gordura. Quando

comparado ao leite bovino, apresenta, na sua composição, maior teor de constituintes, principalmente, gordura e proteína, os quais conferem maior porcentagem de sólidos totais e são responsáveis pelas características físicas (estrutura, cor, sabor) do leite de búfala e dos seus derivados (BRITO; DIAS, 1998; PINTO et al., 2016).

Conforme a *International Dairy Federation* (IDF) (2012) o leite de búfala (*Bubalus bubalis*) é o segundo tipo de leite mais consumido no mundo, ficando atrás somente do leite (de vaca). A produção leiteira das búfalas é considerada de grande importância em vários países (AMARAL, 2005), incluindo o Brasil. Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2018 mostraram que o efetivo do rebanho bubalino no Brasil era de 1.351.631 cabeças (BRASIL, 2018). Queijos como a muçarela e os frescos são os principais produzidos no Brasil a partir do leite captado de búfalas (BUZI et al., 2009).

O interesse econômico pelo leite bubalino se dá em função de seu rendimento industrial, enfatizando a produção de queijo muçarela. Tal leite também se destaca pelo alto teor de gordura, proteína e sólidos totais, aprimorando o investimento em derivados que terão alto valor agregado (ANDRIGHETTO et al., 2015; LIMA et al., 2014).

De acordo Araújo e Gheller (2005), o leite de búfala é melhor em qualidade microbiológica e contagem de células somáticas do que o leite dos bovinos, em consequência da maior concentração de moléculas antimicrobianas como a lactoferrina e lactoperoxidase e, também, maior eficácia antibacteriana dos leucócitos bubalinos.

2.4 Microbiota do leite

O leite é um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de vários microrganismos. O leite é extraído de vacas em condições sanitárias íntegras, dispondo de uma carga microbiana natural do animal, que quando não armazenado em condições ambientais adequadas, podem intensificar o seu crescimento. Uma contaminação secundária pode advir do ordenhador e dos materiais utilizados na ordenha (HORST, 2006). Segundo Tronco (2008),

a microbiota do leite pode ser constituída por leveduras, fungos, vírus e especialmente por bactérias.

Quando o leite cru é mantido em boas condições de refrigeração por um longo período, apresenta parte ou a totalidade das bactérias dos seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomas*, *Bacillus* e *Listeria*, bem como alguns representantes dos gêneros dos coliformes (MELDAU, 2005). Franco e Landgraf (2008) especificaram as bactérias conforme o padrão de temperatura ideal para seu crescimento em mesófilas, psicotróficas, termodúricas, termófilas e psicrófilas.

Os mesófilos são, na maioria das vezes, aeróbios e integram um grupo importante de microrganismos que engloba as bactérias que acidificam o leite, do mesmo modo que os patógenos (NASCIMENTO; SOUZA; 2002). Esses microrganismos se proliferam quando a temperatura da matéria prima situa entre 20° e 40°C, prevalecendo em situações insalubres na aquisição do leite e manipulação. As bactérias atuam na fermentação da lactose causando a fermentação láctica (TRONCO, 2008).

Os microrganismos psicotróficos são identificados por conseguirem crescer mesmo em temperatura de refrigeração abaixo de 7°C, apresentando um excelente desenvolvimento em temperatura ambiente, sendo, assim, mesófilos que toleram baixas temperaturas (SANTOS et al., 2009).

O gênero e a quantidade da microbiota ao término da ordenha, agregado à temperatura e tempo de armazenamento, são medidas que definem a intensidade do crescimento das bactérias no leite cru (MENEZE et al., 2014).

2.5 Bactérias Psicotróficas

Bactérias psicotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C (FRANK et al., 1992). Dentro do grupo de microrganismos psicotróficos presentes no leite, estão bactérias Gram negativo e Gram positivo, onde as mais encontradas no leite são aquelas pertencentes aos seguintes gêneros: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*,

Alcaligenes, Clostridium, Microbacterium, Streptococcus, Corynebacterium, Arthrobacter e Bacillus (SORHOUG; STEPANIAK, 1997). Devido a este fator, devemos compreender estes mecanismos de adaptação a baixas temperaturas, melhorando então as medidas de controle ao aumento destes microrganismos no leite. A capacidade dos psicrótrópicos de se desenvolverem em baixas faixas de temperatura é devida a alterações dos lipídeos e das proteínas da membrana celular destes microrganismos, que são mais resistentes ao estresse térmico promovido pela refrigeração (PINTO, 2004).

As pseudomonas são responsáveis pela produção extracelular de proteases e lipases que conseguem manter-se mesmo após serem submetidos a tratamentos térmicos de esterilização comercial do leite pelo procedimento de UHT (*Ultra High Temperature*). As enzimas atuam no produto cru ou após o processo UHT, clivando proteínas e lipídios, levando a uma descaracterização sensorial do produto (ORDÓÑES, 2005; TRONCO, 2003).

Os psicrótrópicos encontram-se no ambiente, solo, água e tecidos animais e são importantes degradadores do leite e seus derivados (RAJMOHAN, 2002). A grande maioria desses microrganismos são eliminados por tratamento térmico, mas a degradação que ocorre no leite é devido a ação de enzimas produzidas por eles, as quais são termorresistentes e, mesmo passando por tratamentos térmicos como a pasteurização (72 a 75°C de 15 a 20 seg.) ou o tratamento UHT (130 a 150°C de 2 a 4 seg.), não são anuladas, resultando na decomposição do leite por atividade proteolítica e lipolítica (SORHAUG; STEPHANIAK, 1997).

As enzimas proteolíticas atuam em sua maioria na κ -caseína, as micelas da caseína irão se desestruturar por meio de clivagem na porção C-terminal. As submicelas da κ -caseína são as mais afetadas, localizadas na periferia da micela e responsáveis pela estabilidade da partícula de caseína no leite. Quando ocorre hidrólise, há coagulação do leite, de modo semelhante ao que ocorre na coagulação enzimática, gerando problemas tecnológicos como: baixo rendimento em derivados lácteos, amargor do leite e derivados (pela produção exagerada de aminoácidos), gelificação do leite UHT (PINTO, 2004; TONDO et al., 2003; MOREIRA, 2010).

As enzimas lipolíticas agem hidrolisando os triglicerídeos, transformando-os em ácidos graxos de cadeia curta, através da lecitinase, uma importante lipase sintetizada pelos psicrotróficos, que age rompendo a membrana dos glóbulos de gordura contribuindo com a degradação dos lipídeos, produzindo odor desagradável e rancificação no leite e derivados lácteos (PINTO, 2004; TONDO et al., 2003; NUNES, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite cru refrigerada e de leite cru refrigerada de búfala, foram coletadas em tanques de expansão em um laticínio no município de Piumhi-MG, em frascos estéreis de 80 ml, as amostras foram coletadas em duplicata, com uma repetição. As amostras foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável até o laboratório de microbiologia do Centro Universitário de Formiga (UNIFOR – MG), onde foram analisadas no período de março a maio de 2019, sendo analisadas no mesmo dia da coleta.

Foi feita a homogeneização de cada amostra, que foi diluída serialmente em tubos contendo 9ml de solução de salina estéril (0,9% NaCl) até a diluição 10^{-4} . Foi colocado 1ml de cada diluição em placas de Petri que foram cobertas, em seguida, com ágar BHI (brain heart infusion, Himedia, Mumbai, India) fundente. Logo após, seguiu-se com incubação a 37°C, por 48h, seguindo metodologia adaptada de Figueiredo (2017).

A princípio, os isolados bacterianos foram analisados quanto à característica morfológica das suas colônias e quanto às suas características morfotintoriais, as quais foram avaliadas pela coloração de Gram e visualizadas em microscopia por imersão, utilizando o aumento de 100x em microscópio óptico (Olen, K55-BA, China). As colônias que desenvolveram no meio ágar BHI foram separadas de acordo com suas características e colocadas em tubos contendo caldo BHI, para que posteriormente fossem plaqueadas podendo definir sua capacidade de produzir protease e lipase. A capacidade de produzir proteases foi determinada em ágar caseinato de cálcio (Merck, Darmstadt, Alemanha), e de produzir lipases, em ágar tributirina (Merck, Darmstadt), de acordo com Frank et al. (1992), seguindo com incubação a 7°C e 37°C por sete dias. Após o plaqueamento para verificar a atividade enzimática a 7°C, as placas foram colocadas na geladeira por sete dias, onde a temperatura foi monitorada a fim de manter a temperatura constante. A proteólise e a lipólise, quando estão presentes, se destacam por uma região clara (halo) em volta da colônia. De acordo com Apha (2001), a incubação das placas a 7°C são para contagem de psicotróficos e a 37°C para mesófilos. Os resultados encontrados são expressos em unidades formadoras de colônias por ml de leite (UFC/ml).

Para fazer a quantificação de psicotróficos presente no leite, os órgãos de controle de qualidade internacional indicam a metodologia de semeadura em superfície de diluições seriadas do leite seguido, de incubação com temperatura a 7°C por sete dias (FRANK; YOUSSEF, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTAGEM DE MICROORGANISMOS

É desejável que o leite tenha uma contagem baixa de psicotróficos, uma vez que esses microrganismos possuem uma atividade metabólica que causa alterações bioquímicas nos constituintes e diminuem a prazo de validade dos produtos lácteos (ARCURI et al., 2008). De acordo com a Instrução Normativa nº76 vigente, o leite cru refrigerado na propriedade deve apresentar Contagem Padrão em Placas de no máximo 3×10^5 UFC/ml e limite máximo de Contagem Padrão em Placas antes do seu processamento no estabelecimento beneficiador de até 9×10^5 UFC/ml (BRASIL, 2018).

Nas amostras de leite cru, os valores da contagem de microrganismos totais encontrados foram de $1,63 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^2$ UFC/ml, enquanto a contagem encontrada no leite cru refrigerado de búfala foi de $7,7 \times 10^6 \pm 1,42 \times 10^6$ UFC/ml, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Contagem (média±desvio padrão) de micro-organismo totais a 37°C de leite cru refrigerado e leite cru refrigerado de búfala de um laticínio em Piumhi-MG

Amostra (espécie leiteira)	Contagem±DP (UFC/ml)
V (Bovina)	$1,63 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^2$
B (Bubalina)	$7,7 \times 10^6 \pm 1,42 \times 10^6$

Neto (2018) relatou contagem elevada de bactérias totais, onde os valores encontrados foram de $9,6 \times 10^6$ UFC/ml a $1,32 \times 10^7$ UFC/ml. Estudos realizados por Nero et al. (2005) em fazendas leiteiras nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais também apresentaram, em 48,60% das amostras, contagem acima de 1 milhão (10^6). Lima et al. (2016), apresentaram em seus estudos resultados de contagem de bactérias mesófilas de 4×10^4 UFC/ml na amostra in natura e $6,1 \times 10^2$ UFC/ml no leite pasteurizado.

A microbiota presente no leite de búfala está ligada aos costumes do animal e o seu manejo na ordenha. Uma razão de essa espécie apresentar maior contagem de microrganismo é o hábito de imergir em água e

movimentar-se em locais alagadiços a fim de obter conforto térmico, desse modo tornando os tetos da búfala mais difíceis de realizar uma higienização adequada (TEIXEIRA et al., 2005).

Logo após a contagem de microrganismos, as colônias que foram isoladas em meio ágar BHI foram caracterizadas conforme suas características morfológicas, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3 (para isolados do leite bovino e bubalino, respectivamente). O leite cru refrigerado apresentou sete morfotipos diferentes, enquanto o leite cru refrigerado de búfala apresentou apenas três morfotipos.

Tabela 2 - Caracterização morfológica das colônias isoladas em ágar BHI do leite cru refrigerado de um laticínio de Piumhi-MG.

Amostra	Características			
	Cor	Borda	Forma	Tamanho
V1.1	Branca	Regular	Redonda	Pequenas
V1.2	Laranja	Regular	Redonda	Pequenas
V1.3	Bege	Regular	Redonda	Grandes
V1.4	Amarela	Regular	Redonda	Pequenas
V2.1	Branca	Regular	Redonda	Pequenas
V2.2	Bege	Regular	Redonda	Grandes
V2.3	Amarela	Regular	Redonda	Pequenas

Tabela 3- Caracterização morfológica das colônias isoladas em ágar BHI do leite cru de búfala refrigerado de um laticínio de Piumhi-MG.

Amostra	Características			
	Cor	Borda	Forma	Tamanho
B1.1	Branca	Irregular	Indefinida	Grandes
B1.2	Laranja	Regular	Redonda	Pequenas
B2.1	Branca	Irregular	Indefinida	Grandes

4.2 CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIAIS

Na morfotintura feita por meio da coloração de Gram verificou-se que, das dez colônias isoladas, seis eram Gram positivo (60%) e quatro eram

Gram negativo (40%) conforme apresentado na Tabela 4. Os resultados encontrados na morfotintura desse presente trabalho diferem dos resultados encontrados no trabalho de Neto (2018), onde os resultados da classificação morfotintorial obtiveram frequência maior para Gram negativo, sendo 57,1% e com frequência menor para Gram positivo, 42,8%.

Tabela 4- Morfologia e classificação morfotintorial dos microrganismos isolados de leite cru e leite cru de búfala de um laticínio de Piumhi-MG observadas em microscopia óptica após a coloração de Gram

	Amostra	Morfologia (arranjo)	Classificação morfotintorial
R e s u	V1.1	Coco (cachos)	Gram positivo
	V1.2	Coco (cachos)	Gram positivo
	V1.3	Bacilo (sem arranjo)	Gram negativo
	V1.4	Coco (cachos)	Gram positivo
	V2.1	Bacilo formador de esporos (sem arranjo)	Gram positivo
	V2.3	Bacilo (sem arranjo)	Gram negativo
	V2.4	Coco (cachos)	Gram positivo
	B1.1	Cocobacilo (sem arranjo)	Gram positivo
	B1.2	Bacilo (sem arranjo)	Gram negativo
	B2.1	Bacilo (sem arranjo)	Gram negativo

Resultados encontrados por Arcuri et al. (2008) mostraram que, das 43 amostras de leite cru refrigerado coletadas em propriedades rurais, observou-se uma levedura e 308 bactérias psicotróficas, sendo 250 (81,2%) Gram negativo e 58 (18,8%) Gram positivo, resultados que também diferem dos encontrados nesse trabalho. Os autores ainda afirmam que as bactérias Gram negativo, particularmente *Pseudomonas* spp., são determinantes pela deterioração de leite cru refrigerado. Pinto et al. (2015) encontrou em seus resultados entre os microrganismos isolados que 22% eram Gram positivo e 78% Gram negativo.

As características morfológicas encontradas nas amostras mostram que 50% exibem características de bacilos, onde quatro são bacilos Gram negativo e um Gram positivo. Um bacilo Gram positivo foi identificado como formador de esporos conforme demonstrado na Tabela 4. Bactérias do gênero *Bacillus* exibem caráter de bastonetes Gram positivo formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, diferenciando do gênero *Clostridium* que são estritamente anaeróbios. A maior parte dos *Bacillus* são mesófilos, podendo ter espécies termófilas e psicrótróficas. Esses microrganismos produzem toxinas que tendem a causar gastroenterites alimentares (VAEREWIJK et al., 2001; JAY, 2005; LOGAN; DE VOS, 2009).

Os coliformes apresentam características de bactérias Gram negativo, com forma de bacilo e que não formam esporos (PARUCH e MAEHLUM, 2012). Essas bactérias tem crescimento rápido no leite, principalmente em temperaturas maiores que 20°C, fazendo a metabolização das proteínas e lactoses levando a produção de gás (CO₂ e H₂) e sabor desagradável (WALSTRA, 2006).

Características de cocos foram apresentadas em 40% das amostras, sendo todas cocos Gram positivo e 10% exibiram características cocobacilos Gram positivo. Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivo, com catalase positiva que fazem a degradação de glucose em aerobiose e em anaerobiose pela produção de ácidos (SCHLEIFER & BELL, 2009). Os *Staphylococcus* podem contaminar o leite cru através do próprio animal, pelo ordenhador através de suas mãos, e pelos equipamentos de ordenha e até pelo ambiente da sala de ordenha (LUCHEIS, 2012). As espécies que são relevantes em alimentos são *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. intermedius* e *S. aureus*, e estão associadas aos relatos de intoxicação alimentar (Santana, 2010). O *S. aureus* presente no leite cru é um problema que engloba a saúde pública, uma vez que, o risco de transmissão das toxinas para o consumidor é extremamente alta já que resistem ao tratamento térmico e às enzimas proteolíticas (LUCHEIS, 2012).

Pereira et al. (2013) mostraram em seus estudos que das bactérias Gram positivo 57,2% demonstraram ser cocos, 38,4% de bacilos e 4,4% de cocobacilos. Das bactérias Gram negativo houve predominância de cocobacilos em 79,5% e bacilos com 20,5%. Em 150 amostras de leite UHT

integrais analisadas por Bersot et al. (2010), ocorreu predominância de cocos Gram positivo. Estudos realizados por Coelho et al. (2001) demonstram que após isolarem 174 colônias, foram identificadas as morfologias e classificadas como Gram positivo 98,3% de bastonetes e 1,7% cocos. Jay (2005) indica os cocos como mais tolerantes ao calor quando comparados aos bastonetes formadores de esporos.

4.3 Caracterização da presença de psicrotrófico e do seu perfil proteolítico e lipolítico

Os psicrotróficos são um grupo crítico entre os proteolíticos e lipolíticos. Algumas cepas conseguem produzir proteases e lipases no meio extracelular. Essas, por sua vez, são resistentes aos tratamentos térmicos usados pelas indústrias. As enzimas conseguem agir tanto no leite cru, como no leite submetido a tratamento térmico, degradando, desse modo, proteínas e lipídeos, alterando as características sensoriais do leite (ORDÓÑES, 2005; TRONCO, 2003).

Os resultados obtidos nessa segunda etapa mostraram baixa ocorrência de microrganismos com atuação proteolítica e ausência de microrganismos com capacidade lipolítica (a 37°C), conforme mostrado na Tabela 5. Os resultados obtidos por Pinto et al. (2015) mostraram que dentre as bactérias Gram negativo fermentadoras de glicose, representadas por 46,2% do total, todas apresentavam atividade proteolítica a 6,5°C, 21°C e 35°C, enquanto as com atividade lipolítica foram observadas em menor proporção. Nömberg, Tondo e Brandelli (2009) observaram em seu estudo, que houve uma grande variação da atividade proteolítica, visto que algumas amostras demonstraram uma alta atividade e outras atividade baixa.

Tabela 5 – Caracterização psicotrófica (crescimento a 7°C por sete dias) e quanto à atividade enzimática (proteólise e lipólise a 7° e a 37°C) dos microrganismos isolados de leite cru e leite cru de búfala de um laticínio de Piumhi-MG

Amostra	Crescimento a 7°C por 7 dias	Lipólise a 7°C	Proteólise a 7°C	Lipólise a 37°C	Proteólise a 37°C
V1.1	Não	Não	Não	Não	Não
V1.2	Não	Não	Não	Não	Não
V1.3	Não	Não	Não	Não	Não
V1.4	Não	Não	Não	Não	Sim
V2.1	Não	Não	Não	Não	Não
V2.3	Não	Não	Não	Não	Não
V2.4	Não	Não	Não	Não	Sim
B1.1	Não	Não	Não	Não	Não
B1.2	Não	Não	Não	Não	Não
B2.1	Não	Não	Não	Não	Não

Beloti et al. (2015), em seu trabalho, mostram que não houve diferença significativa nos resultados encontrados nas contagens de psicotróficos em tempos e temperaturas diferentes de incubação. Nesse mesmo estudo, não foi observada distinção importante de contagens de psicotróficos nos diferentes métodos de incubação, desse modo, a validação do binômio tempo/ temperatura não interferiu na contagem.

Pinto et al. (2015) mostram em seus estudos que as bactérias Gram positivo apresentam maior atividade proteolítica, com baixa atividade de lipases. Entretanto, as bactérias Gram negativo fermentadoras de glicose apresentaram uma relevância maior na atividade proteolítica a 6,5°C, 21°C e 35°C. As bactérias Gram negativo não-fermentadoras apresentaram atividade proteolítica associada a lipolitises, a 6,5°C e 21°C.

Tebald et al. (2008) em seus estudos mostram que dos isolados do gênero *Staphylococcus*, vários apresentaram atividade enzimática e somente dois não demonstraram atividade lipolítica e proteolítica. A atividade enzimática permite o crescimento exacerbado dos representantes desse gênero, sendo o leite considerado um meio perfeito para o seu desenvolvimento tornando-o perigoso para a saúde do consumidor, caso ocorra ingestão do leite e derivados sem tratamento térmico.

5 CONCLUSÃO

O leite cru refrigerado e o leite cru refrigerado de búfala captados por um laticínio de Piumhi- MG apresentaram altas contagens de microrganismos mesófilos, ficando fora do padrão exigido pela Instrução Normativa nº 76 (BRASIL, 2018), sendo que o leite de búfala obteve contagens maiores ao ser comparado ao leite cru. A contagem de microrganismo maior no leite de búfala refrigerado está diretamente ligada ao comportamento da espécie. A quantificação de microrganismos mesófilos é de grande importância, pois são bactérias que acidificam o leite, tornando a matéria-prima imprópria para o consumo. Entretanto, a avaliação dos microrganismos quanto ao seu perfil psicrotrófico, assim como quanto à sua atividade proteolítica e lipolítica, apresentaram resultados favoráveis, visto que não ocorreram resultados expressivos nesse quesito, o que consiste em um aspecto favorável à utilização desse leite para o beneficiamento e produção de derivados

REFERÊNCIAS

- ANDRIGHETTO, J. M. et al., Efeito da monensina sódica sobre a produção e composição do leite, produção de mozzarella e o escore de condição corporal de búfalas murrah. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.34, p.573-581, 2005.
- AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N. D.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.106-110,2005.
- APHA. American Public Health Association. For the **Examination of Dairy Products**.Ed. Robert T. Marshall. 17 Ed. 2001
- Araújo D.K.G. & Gheller V.A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revta Bras. Reprod. Anim.** 29:77- 83,2005.
- Arcuri, E. F., P. D. L. Silva, M. A. V. P. Brito, J. R. F. Brito, C. C. Lange, M. M. A. Magalhães. 2008. Counting, isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from refrigerated raw milk. *Ciência Rural*, Santa Maria, vol.38, no.8.
- BALESTRINI, A; PASQUALOTTO, W. **Avaliação da contagem bacteriana no leite *in natura* comparando o descarte ou não dos três primeiros jatos de leite em três propriedades, do município de Pinhalzinho – SC.** [online]. 2011. 28 f. Monografia (Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Produção de Leite)- Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná, Paraná. Disponível em: <http://tcconline.utp.br/?p=6837>. Acesso em: 18 março. 2019.
- BELOTI, V; JÚNIOR, JCR; TAMANINI, R; ARAÚJO, JPA DE; YAMADA, A. K., ANTÔNIO, N.DA S. Enumeração de microrganismo psicrotóxicos e termodúricos psicrotóxicos de leite, comparação de metodologias. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.70,n.1, p. 17-23, jan/fev. 2015.
- BERSOT, L. S.et al. Avaliação microbiológica e físico-química dos leite UHT produzidos no Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.645-652, 2010.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 **Publicado em: 30/11/2018 | Edição: 230 | Seção: 1 | Página: 9 DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO.**

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 **Publicado em: 30/11/2018 | Edição: 230 | Seção: 1 | Página: 10 DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO.**

BRITO, J. R.F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite.** 1998. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Gado de Leite. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/>> Acesso em: 18 março 2019.

BUZI, K.A; PINTO, J.P.A.N.; RAMOS, P.R.R.; BIONDI, G.F. Microbiological analysis and electrophoretic characterization of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Food and Science Technology**, v.29(1), p.7-11, 2009.

COELHO, P. S.et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.2, p.1-7, 2001.

FERREIRA, M. A. **Controle de qualidade físico-químico em leite fluído.** Centro de Apoio Tecnológico da Universidade de Brasília (UnB). Dossiê Técnico 2007. Disponível em: <<http://respostatecnica.org.br/dossietecnico/downloadsDT/NjM=>>. Acesso em: 05 de março. 2019.

FIGUEIREDO, N. C. **Leite de cabra: diagnóstico de qualidade na macrorregião da Zona da Mata Mineira e estudo da degradação do leite armazenado por sete dias em condições laboratoriais**, Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 47 p.: il., 2017.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2003.

FRANK, J.F. et al. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products.** 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.271-286.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products.** New York: APHA, 1992. p. 271-286.

FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Test for groups of microorganisms. In: WEHR, H. M.; FRANK, J. K (Eds.) **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th ed. Washington: American Public Health Association, 2004. Chapter 8, p. 239-242.

Froeder Arcuri, Edna; Lima da Silva, Priscilla Diniz; Vasconcelos Paiva Brito, Maria Aparecida; Renaldi Feitosa Brito, José; Lange, Carla Christine; Anjos Magalhães, Margarida Maria dos. **Contagem, isolamento e caracterização**

de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado.

Ciência Rural, vol. 38, núm. 8, novembro, 2008, pp. 2250-2255 Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Brasil.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. D. S. M. **Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção.** Ciência e Agrotecnologia, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

HORST, J. A. Impacto da refrigeração na Contagem Bacteriana do leite. In: MESQUITA, A.J. (Org.); DURR, J.W (Org.); COELHO, K.O (Org.). **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil.** Goiânia: Talento, 2006. p. 163-174. v. 1.

IDF. **International Dairy Federation.** The World Dairy Situation 2012. Bulletin of the IDF nº.458/2012, 2012. 235p.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

LIMA, L.N.C.; TÔRRES, L.; SILVA, L.K.B.; SANTOS, R.S.; CRUZI, T.M.S.; FIGUEIREDO, E.L.-Avaliação microbiológica do leite in natura e pasteurizado comercializado no município de Benerides-PA. **SCIENTIA PLENA.** VOL12. num.06, 2016.

LIMA, M.F.; COSTA, R.R.G.F. Análises físico-químicas e microbiológicas de ricota fresca do laticínio do sudoeste goiano. **Revista de Biotecnologia & Ciência,** v. 2, n. 2, p. 75-88, 2014.

LIMA NETO, Eudoro da Costa. **Quantificação de micro-organismos e classificação de sua atividade enzimática proteolítica e lipolítica em leite cru captado em laticínios no município de Piumhi-MG /** Eudoro da Costa Lima Neto. – 2018. 28 f.

LOGAN, N.A.; DE VOS, P. Genus I. Bacillus. In: DE VOS, P.; GARRITY, G.M.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes.** 2. ed. Vol. 3. Springer, 2009. p. 21-127.

Lucheis, S. B. 2012. vigilância para *Staphylococcus aureus* produtores de toxinas em leite. **Pesquisa e Tecnologia,** vol. 9, no.1.

MELDAU, Débora Carvalho. A microbiota do leite de vaca. In: JAY, James M. (Org.). **Microbiologia de Alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/microbiologia/a-microbiota-do-leite-de-vaca/>> Acesso em:12 set. 2016.

MENEZE, M. F. C. et al. Microbiota e Conservação do leite. **Rev. REGET-** v. 18. p. 76-89 Ed. EspecialVI Mai. 2014.

MOREIRA, G. I. P. **Caracterização de bactérias Gram positivas psicrotróficas aderidas em tanques de refrigeração de leite cru quanto a espécies, expressão de enzimas e perfis de resistência a antimicrobianos.** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, UFLA. Lavras, 104p. 2010.

NASCIMENTO, M. S.; SOUZA, P. A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicrotróficos e a prova da redutase em leite cru resfriado. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 81-87, jun. 2002.

NERO, Luís Augusto et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

NETTO, F. G. S; BRITO, L. G.; FIGUEIRÓ, M. R. A ordenha da vaca leiteira. **Comunicado Técnico, 319.** Embrapa Rondônia, 2006.

NORNBERG, M. L. B. F.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n.2, 2009. p. 157- 163.

NUNES, K. B. **Caracterização bioquímica de bactérias psicrotróficas e produção de enzimas termorresistentes em leite cru.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 64p. 2017.

ORDOÑEZ, et al. **Tecnologia de alimentos** – Alimentos de Origem Animal. São Paulo: Ed. Artmed, v. 2, 2005.

PARUCH, A. M., T. Maehlum. 2012. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. **Ecological Indicators** 23, p.140-142.

PAULA, F. P.; CARDOSO, C. E; RANGEL, M. A. C. Análise físico-químico do leite cru refrigerado proveniente das propriedades leiteiras da região sul fluminense. **Rev. Eletrônica TECCEN, vassouras**, v. 3, n. 4, p. 7-8, out/dez. 2010.

PEREDA, J. A. O. et al. **Tecnologia de alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2005.v. 2.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT.** 2004. 97 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S.G.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

PORTO, E. **Microbiologia do leite**, 1998. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/TecnologiaLeite.pdf>>. Acesso em: 23 de março. 2019.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 205- 213, 2002.

REIS TEBALDI, Victor Maximiliano; Coutinho de OLIVEIRA, Thales Leandro; AndradeBOARI, Cleube; Hilsdorf PICCOLI, Roberta Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e Proteolítica **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 28, núm. 3, julho-septiembre, 2008, pp. 753-760 Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas, Brasil.

ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. Third Edition. ISBN 0-471-38596-4. Copyright © 2002. Wiley-Interscience, Inc. New York – USA. Microbiology of soft cheese, 479p – 513p. 765p. 2002.

SANTANA, E. H. W. et al. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 143-154, 2001.

SANTANA, E. H. W., V. Beloti, L. C. Aragon-alegro, M. B. O. C. Mendonça. 2010. **Estafilococos em alimentos**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, vol.77, no.3, p.545-554.

SANTOS, Marcos Veiga. **A importância do resfriamento do leite na fazenda**. [S.l.: s.n.], 2000. Disponível em: <www.milkpoint.com.br/.../qualidade-do-leite/aimportancia-do-resfriamento-do-leite-> Acesso em: 23 março. 2019.

SANTOS, P. A. et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, 2009.

SCHLEIFER, K-H. & BELL, J. A. 2009. "Staphylococcaceae". In: VOS, P., GARRITY, G. M., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., RAINEY, F. A., SCHLEIFER, K-H. & WHITMAN, W. B. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology: the Firmicutes**. New York: Springer. p. 392-426.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SOUZA, R.C. RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICO NO LEITE. 2006.44 F. Monografia (**Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal**) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ

TEIXEIRA, L.V.; BASTIANETTO, &; OLIVAR, P. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Produção Animal**. Belo Horizonte, n.2, p. 96-100, abr./jun. 2005.

TONDO, E. C.; LAKUS, F. R.; OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A. Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 146-150, 2003.

TRONCO, V. M. Conceitos Fundamentais. In: **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Ed.3. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2008. p. 17-92.

TRONCO, Vania M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3. ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2003.

VAEREWIJCK, M.J.M. et al. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, n.6, p 1074- 1084, 2001.