

Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado

Counting, isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from refrigerated raw milk

Edna Froeder Arcuri* Priscilla Diniz Lima da Silva^{II} Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito^I
José Renaldi Feitosa Brito^I Carla Christine Lange^I Margarida Maria dos Anjos Magalhães^{II}

RESUMO

Com os objetivos de quantificar, isolar e caracterizar bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado, produzido na região da Zona da Mata de Minas Gerais e Sudeste do Rio de Janeiro, foram analisadas amostras de leite coletadas de 20 tanques coletivos e 23 tanques individuais. As contagens de bactérias psicotróficas nas amostras de leite para os dois tipos de tanques de refrigeração variaram entre 10^2 e 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) ml^{-1} , porém, um maior número de tanques coletivos apresentou contagens acima de 1×10^5 UFC ml^{-1} . Foi verificada a predominância de bactérias psicotróficas gram-negativas (81,2%), que foram identificadas pelos sistemas API 20E e API 20NE nos gêneros: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas* e *Yersinia*. As bactérias gram-positivas (18,8%) foram identificadas com API 50 CH, API Coryne e API Staph, nos gêneros: *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellum/Microbacterium*, *Kurthia* e *Staphylococcus*. Os sistemas API utilizados não identificaram todos os isolados bacterianos. *Pseudomonas* foi o gênero mais isolado e *P. fluorescens* foi a espécie predominante. A maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade proteolítica e/ou lipolítica a temperaturas de refrigeração de 4°C, 7°C e 10°C, evidenciando seu alto potencial de deterioração do leite e dos produtos lácteos. Os resultados ressaltam que maior atenção deve ser dada aos procedimentos que impeçam a contaminação do leite por esses microrganismos.

Palavras-chave: bactérias psicotróficas gram-negativas, bactérias psicotróficas gram-positivas, proteases, lipases.

ABSTRACT

This study aimed to quantify, isolate and characterize psychrotrophic bacteria from refrigerated raw milk produced at the 'Mata' Region of Minas Gerais State and Southeast of Rio de Janeiro State, Brazil. Raw milk samples, were collected at the farms, from 20 collective refrigerated tanks and 23 individual refrigerated tanks. The psychrotrophic bacteria counting ranged from 10^2 to 10^7 Colony Forming Units (CFU) ml^{-1} for both types of refrigerated tanks, but most of the collective tanks showed counts higher than 1×10^5 CFU ml^{-1} . Predominance of psychrotrophic gram-negative bacteria (81.2%), that were identified by API 20E and API 20NE as belonging to genera: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas* e *Yersinia* were observed. The gram-positive bacteria (18.8%), were identified by API 50 CH, API Coryne and API Staph, to genera: *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellum / Microbacterium*, *Kurthia* e *Staphylococcus*. The API systems utilized could not identify all the bacterial isolates. *Pseudomonas* was the genus most isolated with *P. fluorescens* as the predominant species. Most of the isolates presented proteolytic and/or lipolytic activity at 4°C, 7°C and 10°C showing high potential for milk and milk products spoilage. The results indicated that more attention must be taken to the procedures necessary to reduce milk contamination with psychrotrophic bacteria.

Key words: Psychrotrophic gram-negative bacteria, Psychrotrophic gram-positive bacteria, proteases, lipases.

^IEmbrapa Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, 36038-330, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: edna@cnppl.embrapa.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), 59072-970, Campus Universitário, Natal, RN, Brasil.

INTRODUÇÃO

Bactérias psicrotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C (FRANK et al., 1992), sendo os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado e de seus derivados. A ação deterioradora das bactérias psicrotróficas se deve principalmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases, que hidrolisam respectivamente a proteína e a gordura do leite. A maioria das bactérias psicrotróficas não sobrevive à pasteurização, porém, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, podendo resistir mesmo ao tratamento UHT e permanecerem ativas. A presença de enzimas termoestáveis no leite cru é especialmente prejudicial para a qualidade do leite UHT devido à sua estocagem à temperatura ambiente por longos períodos de tempo. Outros defeitos dessas enzimas incluem alterações de sabor e odor em diversos produtos e redução do rendimento dos queijos (CHAMPAGNE et al., 1994; SØRHOUG & STEPANIAK, 1997; CHEN et al., 2003).

O grupo de microrganismos psicrotróficos inclui bactérias gram-negativas e gram-positivas. Os principais gêneros isolados, em estudos conduzidos em países de clima temperado, são: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes* (gram-negativas), *Clostridium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus* (gram-positivas). Bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e algumas estirpes de *Bacillus cereus* isoladas de leite também são psicrotróficas (SHAH, 1994; SØRHOUG & STEPANIAK, 1997).

No Brasil, alguns estudos evidenciaram altas contagens de bactérias psicrotróficas em leite cru refrigerado (SOUZA et al., 1999; BRITO et al., 2002; BRUM et al., 2004; PINTO et al., 2006), mas pouco se conhece sobre a composição desta microbiota e suas propriedades hidrolíticas. Os objetivos deste trabalho foram quantificar, isolar e identificar bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado na fazenda e avaliar o seu potencial de deterioração.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de 20 tanques coletivos e 23 tanques individuais em propriedades leiteiras, na região da Zona da Mata, Minas Gerais (MG) e na região Sudeste do Rio de Janeiro, durante 15 meses. Após a agitação programada do tanque, foram coletados cerca de 500mL de leite utilizando-se um coletor de aço inoxidável e

frascos estéreis. As amostras foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo até o Laboratório de Microbiologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, onde foram analisadas no mesmo dia da coleta.

Para a contagem e o isolamento, diluições das amostras foram plaqueadas em *Plate Count Agar* (Difco) e as placas foram incubadas a 7°C por 10 dias (FRANK et al., 1992). Após a contagem, foram isolada cinco colônias de cada placa em ágar Nutriente (Difco), que foram incubadas a 21°C por 24 horas para identificação.

Primeiramente os isolados bacterianos foram avaliados quanto à morfologia celular, à reação de Gram, metabolismo oxidativo e/ou fermentativo da glicose (OF), à produção de oxidase e catalase, ao crescimento em Agar MacConkey (Difco), à motilidade e à presença de esporos (BARROW & FELTHAN, 1995), para definir o sistema API de identificação (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) a ser usado. A seguir, as bactérias gram-negativas foram identificadas por gênero ou espécie empregando-se os sistemas API 20E e API 20NE e as bactérias gram-positivas empregando-se os sistemas API Staph, API Coryne e API 50 CH, de acordo com as orientações do fabricante. Os sistemas API foram repetidos para 50% dos isolados para garantir a identificação.

A capacidade de produzir proteases foi determinada em ágar caseinato (Merck) e de produzir lipases, em ágar tributirina, segundo FRANK et al. (1992), com incubação a 4°C, 7°C e 10°C durante 10 dias e a 21°C durante três dias. A proteólise e a lipólise são evidenciadas por uma zona clara ao redor da colônia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem de bactérias psicrotróficas

O número de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas na produção e ao tempo e à temperatura em que o leite é armazenado. Uma contagem baixa de psicrotróficos no leite é de fundamental importância para sua qualidade, pois a atividade metabólica desses microrganismos resulta em alterações bioquímicas nos constituintes do leite que limitam a vida de prateleira dos produtos lácteos.

As contagens de bactérias psicrotróficas nas amostras de leite para os dois tipos de tanques de refrigeração variaram entre 10^2 e 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) ml⁻¹. A maioria dos tanques individuais apresentou contagens inferiores a 1×10^5 UFC ml⁻¹ e a maioria dos tanques coletivos apresentou contagens acima deste valor. Esses dados indicam que em muitas propriedades houve deficiência

nas práticas higiênicas e a mistura de matéria-prima de diversos produtores em tanques coletivos aumentaram os riscos, comprometendo a qualidade final do produto.

Contagens semelhantes de psicotróficas também foram encontradas por PINTO et al. (2006) para leite de fornecedores de uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata Mineira. Nas 33 amostras de leite coletadas de tanques individuais, as contagens variaram de $2,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^7$ UFC/ml, e para 12 tanques coletivos, de $8,9 \times 10^2$ a $3,2 \times 10^6$ UFC/ml.

Os resultados apresentados indicam que há propriedades em que as contagens de bactérias psicotróficas são muito altas, especialmente em tanques coletivos. Portanto, treinamentos devem ser direcionados para a melhoria das condições de higiene

de ordenha e de armazenamento do leite para essas propriedades.

Identificação e caracterização das bactérias psicotróficas

Das 43 amostras de leite cru refrigerado coletadas nas propriedades rurais, foram isoladas uma levedura e 308 bactérias psicotróficas, sendo 250 (81,2%) gram-negativas e 58 (18,8%) gram-positivas (Tabela 1). A maioria (161) das bactérias gram-negativas foi identificada à espécie: *Pseudomonas fluorescens* (94), *Pseudomonas putida* (três), *Aeromonas hydrophila* (20), *Aeromonas sobria* (uma), *Aeromonas caviae* (uma), *Burkholderia cepacia* (12), *Klebsiella oxytoca* (10), *Erwingella americana* (sete), *Hafnia alvei* (sete),

Tabela 1 - Identificação das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas utilizando os sistemas de identificação API e testes bioquímicos.

Gênero/Espécie	Número de estirpes	% Identificação sistema API
Bactérias Gram-negativas (250)		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	94	98,6 -99,9
<i>Pseudomonas putida</i>	03	99,1
<i>Pseudomonas</i> spp.	11	82,3 -99,4
<i>Acinetobacter</i> spp.	39	78,9-91,9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	20	92,9 - 99,9
<i>Aeromonas caviae</i>	1	98,9
<i>Aeromonas sobria</i>	1	83,8
<i>Aeromonas</i> spp.	5	85,9-99,9
<i>Pantoea</i> spp.	17	* - 99,9
<i>Burkholderia cepacea</i>	12	99,9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	97,4
<i>Klebsiella</i> sp.	1	*
<i>Hafnia alvei</i>	7	99,9
<i>Erwingella americana</i>	7	92,9 -98,2
<i>Moraxella</i> spp.	4	82,2
<i>Chryseomonas luteola</i>	3	97,8 - 99,8
<i>Serratia</i> spp.	3	*-99,4
<i>Yersinia</i> spp.	2	95,7
<i>Enterobacter</i> sp.	1	*
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	96,6
<i>Pasteurella</i> sp.	1	99,3
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	99,8
<i>Methylobacterium</i> sp.	1	88,2
Não identificados	5	
Bactérias Gram-positivas (58)		
<i>Kurthia</i> spp.	7	*
<i>Bacillus</i> sp.	1	*
<i>Bacillus coagulans</i>	1	99,2
<i>Bacillus lentus</i>	2	99,1
<i>Brevibacterium</i> sp.	1	96,2
<i>Cellum/Microbacterium</i>	6	99,9
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	91,9 – 97,4
Não identificada	37	

*Boa identificação para o gênero, segundo o APILAB Plus v.3.3.3 (bioMérieux).

Chryseomonas luteola (três), *Alcaligenes faecalis* (uma), *Methylobacterium mesophilicum* (uma), *Sphingomonas paucimobilis* (uma). 84 bactérias foram identificadas a gênero: *Pseudomonas* (11), *Acinetobacter* (39), *Pantoea* (17), *Aeromonas* (cinco), *Moraxella* (quatro), *Serratia* (três), *Yersinia* (dois), *Klebsiella* (um), *Enterobacter* (um) e *Methylobacterium* (um). Cinco bactérias não foram identificadas por meio do API 20E e API 20NE, que apresentaram resultados como “baixa discriminação, duvidoso ou inaceitável”. *Pseudomonas* foi o gênero mais isolado (43%), sendo *P. fluorescens* a espécie predominante (37,6%). Esses resultados estão coerentes com os de outras pesquisas, que constataram predomínio desse gênero/espécie em leite cru (JAYARAO & WANG, 1999; HOLM et al., 2004; ALATOSSAVA & ALATOSSAVA, 2006; PINTO et al., 2006). A maior ocorrência de *P. fluorescens* pode ser associada ao seu menor tempo de geração a temperaturas de refrigeração e também à sua habilidade em formar biofilme em superfícies de equipamentos e utensílios (JAYARAO & WANG, 1999; HOLM et al., 2004).

Aeromonas hydrophila foi o patógeno predominante, com 20 isolados identificados (Tabela 1). *Aeromonas hydrophila* é um microrganismo de potencial patogênico emergente que causa infecções gastrointestinais (MERINO et al. 1995; DASKALOV, 2006). Esse microrganismo é frequentemente encontrado na água (DASKALOV, 2006) e assim a água utilizada na limpeza de utensílios e equipamentos pode ser fonte importante de contaminação do leite e produtos lácteos.

Os gêneros/espécies patogênicos: *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia cepacea* (anteriormente *Pseudomonas*) e *Klebsiella oxytoca* também incluíram 10 ou mais isolados. A ocorrência dessa diversidade de espécies patogênicas é preocupante e estudos devem ser direcionados para a sua rastreabilidade por meio de sistemas acurados de identificação genotípica.

As bactérias gram-positivas foram identificadas à espécie quando o programa APILAB PLUS indicou identidade >80,0% e a gênero quando indicou “boa identificação para gênero”. Dos 58 isolados, apenas 22 foram identificados, sendo estes pertencentes aos gêneros *Kurtia*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellum/Microbacterium* e *Staphylococcus*. A não identificação dos vários isolados pode ser atribuída ao número insuficiente de testes na galeria API e a limitações da base de dados do programa APILAB PLUS.

ALATOSSAVA & ALATOSSAVA (2006), ao utilizarem o sistema API 20 NE para identificar 67

bactérias isoladas de leite cru, obtiveram para 29 isolados identificação “duvidosa”, “baixa discriminação” ou “inaceitável” e dois isolados não puderam ser identificados. Devido à limitação de identificação destes sistemas bioquímicos, deve-se considerar sua confirmação por caracterização genotípica.

Bactérias gram-negativas, particularmente *Pseudomonas* spp., são os principais responsáveis pela deterioração de leite refrigerado. Como esperado, a maioria das *Pseudomonas* apresentou atividade enzimática extracelular (Tabela 2). Todas *P. fluorescens* foram lipolíticas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C, sendo que a atividade proteolítica a estas temperaturas foi verificada, respectivamente, em 66%, 74,5%, 88,3% e 95,7% das estirpes. Do total de 108 *Pseudomonas* spp., 60,57% apresentaram as duas atividades de proteólise e lipólise. Os três isolados identificados como *P. putida* foram proteolíticos e lipolíticos. Embora *P. fluorescens* seja mais comumente associada à deterioração de leite, outras espécies como *P. putida*, *P. fragi* e *P. maltophilia* são também comuns (WIEDMANN et al., 2000). Os problemas ou defeitos atribuídos a *Pseudomonas* são rancidez, sabor amargo, sabor de fruta, geleificação em leite UHT, instabilidade térmica do leite, instabilidade do leite ao etanol, resultado falso-positivo na pesquisa por fraude de leite com soro por meio da dosagem do ácido siálico e redução no rendimento na fabricação de queijos (CHAMPAGNE et al., 1994; SØRHOUG & STEPANIK, 1999; ARCURI et al., 2004).

Os gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Burkholderia*, que incluem espécies patogênicas, também evidenciaram alto potencial de deterioração. (Tabela 2). Todas *B. cepacea*, a maioria dos *Acinetobacter* (94,9%) e cerca de 50% das *Aeromonas* apresentaram atividade lipolítica em todas as temperaturas. Quanto à proteólise, esta foi verificada para *A. caviae* em todas as temperaturas estudadas, para >50% das *A. hydrophila* a 7°C, 10°C e 21°C, mas para nenhuma *B. cepacea*.

Bactérias psicrotróficas da família *Enterobacteriaceae* podem causar deterioração em leite (BOOR & MURPHY, 2002). Dos 48 isolados, atribuídos a sete gêneros desta família (*Pantoea*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Yersinia* e *Enterobacter*), nenhum apresentou atividade proteolítica a 4°C, seis apresentaram a 7°C e dez apresentaram a 10°C e 21°C. Atividade lipolítica foi verificada para um isolado a 4°C, cinco a 7°C e nove a 10°C e 21°C. A atividade enzimática desses microrganismos é espécie específica e depende da temperatura de armazenamento (ALATOSSAVA &

Tabela 2 - Atividade enzimática de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas nas temperaturas de 4°C, 7°C, 10°C e 21°C.

Gênero ou espécie (número de amostras)	-----Nº de estirpes positivas (produção de halo)-----							
	-----Proteólise-----				-----Lipólise-----			
	4°C	7°C	10°C	21°C	4°C	7°C	10°C	21°C
Bactérias Gram-negativas (250)								
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (94)	62	70	83	90	94	94	94	94
<i>Pseudomonas putida</i> (3)	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Pseudomonas</i> spp. (11)	2	4	5	3	8	10	9	9
<i>Acinetobacter</i> spp. (39)	0	4	4	1	37	37	29	37
<i>Aeromonas hydrophila</i> (20)	1	10	14	14	10	11	10	11
<i>Aeromonas caviae</i> (1)	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aeromonas sobria</i> (1)	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>Aeromonas</i> spp. (5)	0	1	5	5	2	3	3	3
<i>Pantoea</i> spp. (17)	0	0	1	1	0	1	4	4
<i>Burkhol. Cepacia</i> (12)	0	0	0	0	12	12	9	12
<i>Klebsiella oxytoca</i> (10)	0	3	3	3	0	1	1	1
<i>Klebsiella</i> sp.(1)	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>Ewingella americana</i> (7)	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Hafnia Alvei</i> (7)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Moraxella</i> spp. (4)	0	0	0	0	4	4	2	4
<i>Chryseomonas luteola</i> (3)	2	2	1	2	2	2	2	1
<i>Serratia</i> spp. (3)	0	0	2	1	0	0	2	1
<i>Yersinia</i> spp. (2)	0	2	2	2	0	2	2	2
<i>Enterobacter</i> sp. (1)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacterium</i> sp. (1)	0	0	0	0	1	1	1	1
<i>Alcaligenes faecalis</i> (1)	0	0	0	0	1	1	1	1
<i>Pasteurella</i> sp. (1)	0	0	0	1	1	1	1	1
<i>Sphingomonas Paucimobilis</i> (1)	0	0	0	0	0	0	1	1
Não identificado (5)	0	0	1	2	4	5	5	5
Bactérias Gram-positivas (58)								
<i>Kurtia</i> spp. (7)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus coagulans</i> (1)	0	1	1	1	0	0	0	0
<i>Bacillus lentus</i> (2)	0	2	2	2	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> sp (1)	0	0	1	0	0	0	1	1
<i>Brevibacterium</i> (1)	0	1	1	1	0	0	0	0
<i>Cellum/Microbacterium</i> (6)	0	6	6	6	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp. (3)	0	0	0	0	0	0	0	0
Não identificados (37)	0	19	29	27	5	6	13	21
Total (308)	71	130	168	168	186	196	196	216

ALATOSSAVA, 2006), como evidenciado por esses dados.

Dos 58 isolados gram-positivos, nenhum apresentou atividade proteolítica a 4°C, mas cinco apresentaram atividade lipolítica a esta temperatura (Tabela 2). Já 50 % desses microrganismos expressaram atividade proteolítica a 7°C e a maioria expressou a 10°C e 21°C, indicando que temperaturas abaixo de 4°C controlam bem a atividade proteolítica destes microrganismos. Em geral, as bactérias gram-positivas foram encontradas com menor frequência e predominaram dentre os isolados de cinco amostras de leite.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram o nível de contaminação de leite cru com bactérias psicrotróficas e que a mistura de matéria-prima de diversos produtores em tanques coletivos pode aumentar os riscos de contaminação. Além disso, os resultados mostram que o grupo psicrotrófico inclui uma diversidade de gêneros bacterianos, com predominância do gênero *Pseudomonas*, e que em sua maioria produz proteases e/ou lipases a temperaturas de refrigeração. Esses resultados evidenciam a necessidade de serem realizados, nas propriedades

rurais, treinamento, implementação e monitoramento contínuo de boas práticas para prevenir contaminação e crescimento microbiano no leite.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (projeto CAG 180) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (projeto 472436), pelo apoio financeiro. Priscilla Diniz Lima da Silva foi bolsista da CAPES.

REFERÊNCIAS

- ALATOSSAVA, P.M.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, v.161, p.334-346, 2006.
- ARCURI, E.F. et al. Efeito do crescimento de *Pseudomonas* sp. proteolítica na estabilidade do leite ao etanol. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., Juiz de Fora, MG. **Revista do ILCT**, v.59, n.339, p.140-144, 2004.
- BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. (ed.). **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University, 1993. 331p.
- BOOR, K.J.; MURPHY, S.C. Microbiology of market milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology handbook**. 3.ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. p.91-122.
- BRITO, M.A.V.P. et al. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora, MG. **Revista do ILCT**, v.57, p.83-88, 2002.
- BRUM, J.V.F. et al. Pesquisa de microrganismos psicrotróficos em leite cru produzido nos estados do Paraná e Santa Catarina. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., 2004, Juiz de Fora, MG. **Revista do ILCT**, v.59, p.150-154, n. 339, 2004.
- CHAMPAGNE, C.P. et al. Psychrotrophs in dairy products : their effects and their control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.34, p.1-30, 1994.
- CHEN, L. et al. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255-275, 2003.
- DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v.17, p.474-483, 2006.
- 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.
- HOLM, L.J. et al. Predominant microflora of downgraded danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1151-1157, 2004.
- JAYARAO, B.M.; WANG, L. A study on the prevalence of Gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2620-2624, 1999.
- MERINO, S. et al. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **Food microbiology**, v.28, p.157-168, 1995.
- PINTO, C.L.O. et al. 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.
- SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p.432-437, 1994.
- SØRHOUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.8, p.35-41, 1997.
- SOUZA, M.R. et al. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., 1999, Juiz de Fora, MG. **Revista do ILCT**, v.54, p.238-241, 1999.
- WIEDMANN, M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2085-2095, 2000.