

Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos

Milk contamination in different points of the process: I) Aerobic mesophilic and psychrotrophics microorganisms

Elsa Helena Walter de Santana¹; Vanerli Beloti²; Márcia de Aguiar Ferreira Barros³;
Luciane Bilia de Moraes⁴; Viviane Vieira Gusmão⁴; Mykel Stefanni Pereira⁴

Resumo: A refrigeração do leite na propriedade e o transporte a granel são medidas cuja implantação visa a melhoria da qualidade microbiológica do leite produzido no país, mas temperaturas em torno de 4°C selecionam uma microbiota denominada psicrotrófica, que independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, multiplica-se bem sob refrigeração e produz enzimas termorresistentes, que comprometem a qualidade principalmente de derivados lácteos e leite UAT. Este trabalho tem como objetivo determinar os principais pontos de contaminação do leite por mesófilos e psicrotróficos no processo de produção leiteira, bem como a eficiência da refrigeração no controle do crescimento destes microrganismos. Avaliou-se cinco (5) propriedades leiteiras da região de Londrina- PR, analisando-se diversos pontos do processo de produção e pesquisando-se microrganismos aeróbios mesófilos (35°C/48hs) e psicrotróficos (21°C/25 hs). Os principais pontos de contaminação foram os latões, tanques de expansão, água residual de equipamentos e utensílios de ordenha e tetos higienizados inadequadamente. Água residual dos tanques de expansão, de latões, tetos higienizados inadequadamente e a clarificadora foram os pontos com maior contagem de psicrotróficos. A quantidade de psicrotróficos encontrada em todos os segmentos do processo de produção pesquisados, foi superior ao que considera-se tolerável (10% da quantidade de mesófilos). No leite refrigerado, o número de psicrotróficos superou o de mesófilos, mostrando que a contagem de mesófilos pode subestimar a real quantidade de microrganismos presentes, sendo os psicrotróficos os indicadores de contaminação ideais neste produto. Como a refrigeração a 4°C não inibe o crescimento deste grupo de microrganismos, deve-se evitar sua incorporação ao leite durante a produção, havendo necessidade da associação de boas práticas em todo o processo produtivo.

Palavras-chave: leite, qualidade, microrganismos, refrigeração.

Abstract: To improve the microbiology quality of the milk produced in Brazil, steps like the refrigeration have been implanted in the dairy sector but, temperatures of 4°C are selective for psychrotrophics microorganisms. These microorganisms, irrespective of their optimum growth temperature, are able to multiply in refrigeration temperature and produce heat-resistant extra cellular enzymes that can cause changes, especially in dairy products and UHT milk. This work has the objective to determine the main points of milk contamination in dairy process and the effect of refrigeration on the control and multiplication of microorganisms. Five properties located in Londrina city- PR were visited. Different points have been assessed in the dairy process and mesophilic (35°C/48hs) and psychrotrophics (21°C/25hs) microorganisms were researched. The main contamination points found were the milk cans, bulk milk tanks, residual water in the dairy equipments and teats bad cleaned. The residual water on the bulk milk tanks, on the cans, teats bad cleaned and the dairy centrifuge equipment were the main source of psychrotrophics. The quantity of psychrotrophics in all points assessed were greater than the ideal limit (10% of the mesophilic count). In the refrigerated milk, the psychrotrophics count over came the mesophilic count, showing that the mesophilic count can under estimate the real microflora of refrigerated milk, what means that psychrotrophics are the best indicators for refrigerated milk contamination. By what means, refrigeration at 4°C is not sufficient to control the multiplication of the psychrotrophics group, is necessary to associate good practices to avoid or control the milk contamination by psychrotrophics in the main contamination points detected in this study.

Key words: milk, quality, microorganisms, refrigeration.

1 Introdução

A qualidade do leite está associada a carga microbiana inicial presente no produto, e quanto maior o número de contaminantes e a temperatura de estocagem, menor será o tempo de conservação do produto (SILVEIRA *et al.*, 1998).

O leite produzido no Brasil apresenta, de maneira geral, altas contagens de microrganismos, demonstrando com isto que há deficiências na higiene de produção (CERQUEIRA *et al.*, 1994).

Beloti *et al.* (1999), ao avaliarem a qualidade microbiológica do leite cru na cidade de Cornélio Procópio,

¹ Mestre em Sanidade Animal, Universidade Estadual de Londrina- UEL, PR

² Docente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UEL

³ Médica Veterinária, responsável pelo LIPOA, UEL

⁴ Alunos Iniciação Científica, UEL

PR, encontraram contagens médias de aeróbios mesófilos de 7,5 milhões de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, e Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais de até 9.000/mL. Cerqueira *et al.* (1994), analisando amostras de leite cru na cidade de Belo Horizonte, MG, encontraram contagens médias de aeróbios mesófilos, de 45 milhões UFC/mL, reafirmando o comprometimento da qualidade microbiológica do leite cru.

Diversos autores, avaliando a qualidade microbiológica do leite pasteurizado em várias regiões do país, encontraram entre 10,0% e 65,0% das amostras, em desacordo com os padrões microbiológicos determinados pela legislação (NADER FILHO; ROSSI JUNIOR, 1989; NADER FILHO; SCHOKEN-ITURRINO, 1989; CERQUEIRA *et al.*, 1994; BELOTI *et al.*, 1997; FAGUNDES *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2001).

Beloti *et al.* (1999a), estudando a microbiota do leite pasteurizado, encontraram uma alta frequência de microrganismos típicos de equipamentos de ordenha, indicando com isto que parte destes microrganismos, estão presentes devido à deficiências na higiene de produção do leite.

Buscando melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil, mudanças no setor lácteo estão sendo implantadas, dando-se ênfase à refrigeração do leite na propriedade e ao transporte a granel.

A refrigeração do leite tem como objetivo controlar a multiplicação de aeróbios mesófilos. Estes microrganismos, em sua maioria, fermentam a lactose produzindo ácido láctico, que causa acidificação do leite comprometendo sua utilização na indústria (FONSECA; SANTOS, 2000). Segundo Bramley e McKinnon (1990), no leite refrigerado em temperatura menor ou igual a 4°C, a multiplicação da microbiota total permaneceu controlada por no mínimo 24 horas, mantendo uma microbiota semelhante a do leite recém ordenhado.

No entanto, a refrigeração em torno de 4°C, permite o crescimento de microrganismos psicotróficos, que multiplicam-se bem nessas temperaturas independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (FONSECA; SANTOS, 2000). Smithwell e Kailasapathy (1995) consideraram a contaminação do leite por microrganismos psicotróficos, o ponto mais importante na determinação da qualidade, não estando sua frequência diretamente relacionada às condições de higiene na produção (BRAMLEY; MCKINNON, 1990).

Os psicotróficos encontrados no leite são ambientais, provenientes do solo, água, vegetação, teto/úbere e de equipamentos de ordenha higienizados inadequadamente (COUSIN, 1982; SOLER *et al.*, 1995). São na maioria microrganismos Gram negativos, sendo o gênero *Pseudomonas* o mais frequente (STADHOUDERS, 1975; COUSIN, 1982; BRAMLEY; MCKINNON, 1990; MUIR, 1996; SORHAUNG; STEPANIACK, 1997). Microrganismos psicotróficos Gram positivos são encontrados em menor frequência, como os gêneros *Micrococcus*, *Bacillus* e *Arthrobacter* (COUSIN, 1982; APHA, 1992). Bolors e

leveduras também possuem gêneros psicotróficos que podem comprometer a qualidade de derivados, principalmente do creme e da manteiga (COUSIN, 1982; FONSECA; SANTOS, 2001).

Conforme Bramley e McKinnon (1990), equipamentos higienizados inadequadamente foram a principal fonte de psicotróficos Gram negativos, variando entre 10% e 50% da microbiota total inicial do leite cru. Thomas e Thomas (1973), consideram que o leite produzido em condições sanitárias inadequadas pode apresentar uma frequência de microrganismos psicotróficos superior a 75% da microbiota total. Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL-RIISPOA, 1980), o leite deve apresentar no máximo 10% de microrganismos psicotróficos, em relação a contagem total de aeróbios mesófilos.

Diante das mudanças no setor lácteo nacional, e visando avaliar a real qualidade do leite refrigerado, estudamos a frequência de microrganismos mesófilos e psicotróficos em diversas fases do processo de produção, determinando os principais pontos de incorporação destes microrganismos ao leite.

2 Material e Métodos

2.1 Características e práticas das propriedades

Este trabalho foi realizado no período de maio de 2000 a junho de 2001, em cinco propriedades leiteiras, sendo uma de leite tipo A, uma de leite tipo B e três de leite tipo C (C1, C2 e C3), todas na região de Londrina, norte do estado do Paraná. Estas propriedades foram selecionadas com o auxílio da Cooperativa Agropecuária de Londrina (CATIVA), de forma a representar as características de manejo, produção e instalações mais frequentes na produção de leite da região.

Na propriedade produtora de leite tipo A, o rebanho bovino Holandês de 60 animais criados em sistema *tie stall* produzem, em média, 900L/dia em duas ordenha diárias. O leite é ordenhado em circuito fechado, sofre refrigeração rápida em refrigerador de placas e em seguida é armazenado em tanque de expansão. Pasteuriza-se o leite a cada dois dias.

A propriedade produtora de leite tipo B, com um rebanho de 93 animais em produção, das raças Holandês e Pardo Suíço, criados em sistema *free stall*, produzem em média 1.700L/dia em duas ordenhas realizadas em sala com circuito fechado. O leite refrigerado em tanques de expansão é recolhido pela cooperativa diariamente ou, a cada dois dias nos períodos de menor produção.

As propriedades produtoras de leite tipo C (C1, C2 e C3) apresentam práticas distintas. Na propriedade C1, o rebanho de aproximadamente 80 animais mestiços mantidos a pasto, produzem em média 960 L/dia. A ordenha mecânica é realizada duas vezes ao dia em estábulo, com sistema "balde ao pé" e com a presença de bezerro. O leite refrigerado é recolhido a cada dois dias.

A propriedade C2, com um rebanho de 30 animais mestiços criados a pasto, produzem em média 500 L/dia em duas ordenhas no estábulo, com sistema de "balde ao pé" sem a presença de bezerras. Dos latões, o leite é transportado para o tanque de expansão de uma propriedade próxima, onde é recolhido a cada dois dias.

A propriedade C3 (microusina), com um rebanho de 145 animais mestiços criados a pasto, possui duas linhas de ordenha. A maior parte da produção, 900 L/

dia, é obtida com ordenha mecânica em circuito fechado, em estábulo e com a presença de bezerro. Uma parte menor da produção, 240 L/dia, é obtida com ordenha mecânica pelo sistema "balde ao pé", sem a presença do bezerro. O leite é pasteurizado diariamente.

As demais características de manejo e produção, bem como, as práticas de higienização de equipamentos de ordenha e pasteurização das propriedades estudadas estão nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Principais características de manejo e de produção observadas em cinco (5) propriedades de leite (tipo A, B, C1, C2 e C3) da região de Londrina, Paraná, no período de maio de 2000 a junho de 2001.

Características das Propriedades	A	B	C1	C2	C3
1. Número de animais em produção	60	93	80	30	145
2. Raça dos animais	Holandês	Holandês e Pardo Suíço	Mestiços	Mestiços	Mestiços
3. Tipo de criação	<i>Tie stall</i>	<i>Free stall</i>	A pasto	A pasto	A pasto
4. Número de ordenhas diárias	02	02	02	02	02
5. Produção média diária de leite	900 L	1.700 L	960 L	500 L	*920 L/ **240 L
6. Tipo de ordenha	Circuito fechado	Circuito fechado	Balde ao pé	Balde ao pé	* **
7. Presença de bezerro	Não	Não	Sim	Não	Sim* Não**
8. Lavagem dos tetos com água e secagem com papel toalha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
9. Prática do pré- <i>dipping</i> com solução clorada	Sim	Não	Não	Não	Não
10. Prática do pós- <i>dipping</i>	Sol. clorada	Sol. iodada	Não	Sol. iodada	Não
11. Prática de higienização dos copos de teteiras durante a ordenha	Esguicho de água	Imersão em sol. clorada	Não	Não	Não
12. Despreza os três primeiros jatos	Sim	Sim	Não	Sim	Não
13. Realização do CMT	Sim	Sim	Não	Sim	Não
14. Refrigerador de placas antes do tanque de expansão	Sim	Não	Não	Não	Não
15. Tanque de expansão a 4°C em média	2.000L	4.000 L	2.000 L	4.000L (coletivo)	2.000L
16. Frequência do recolhimento do leite	Pasteuriza na propriedade	24 hs ou 48 hs	48 hs	48 hs	Pasteuriza na propriedade
17. Frequência da pasteurização	A cada 48 hs	Não pasteuriza	Não pasteuriza	Não pasteuriza	Diária

* Ordenha mecânica em circuito fechado, em estábulo e com a presença de bezerro.

** Ordenha mecânica pelo sistema "balde ao pé", sem a presença do bezerro.

2.2 Pontos de colheita

Foram amostrados 35 pontos na propriedade de leite tipo A, 18 na propriedade de leite tipo B, e nas propriedades C1, C2 e C3 foram analisados 16, 15 e 36 pontos, respectivamente, totalizando 390 amostras, considerando-se três repetições.

Realizou-se o *California Mastitis Test* (CMT) de todos os animais em produção nas propriedades. Selecionou-se então, um número de animais equivalentes a 10% do rebanho em lactação (Tabela 1), sendo 50% positivos e 50% negativos no CMT. Destes animais realizou-se

swabs de tetos sujos e higienizados. Coletou-se também os três primeiros jatos de leite e, após novo CMT, colheu-se uma segunda amostra, representativa do leite da cisterna do úbere.

Dos equipamentos de ordenha e pasteurização quando presentes, foram colhidas amostras de água residual e/ou realizados *swabs* dos seguintes pontos:

- *Swab* de 3 conjuntos de teteiras antes da ordenha;
- *Swab* dos mesmos copos de teteiras durante a ordenha;

Tabela 2 – Principais características das práticas de higienização nos equipamentos de ordenha e pasteurização das cinco propriedades estudadas de leite tipo A, B, C (C1, C2 e C3) da região de Londrina, PR, no período de maio de 2000 a junho de 2001.

Características das Propriedades	A	B	C1	C2	C3
1. Higienização de latões	NE	NE	Detergente levemente alcalino	Detergente neutro	Sabão em pó
2. Higienização de tanques de expansão	Manual com detergente neutro	Circuito fechado	Detergente levemente alcalino	Circuito fechado	Sabão em pó
3. Higienização das teteiras	Circuito fechado	Circuito fechado	Detergente alcalino clorado	Detergente Alcalino clorado	Detergente alcalino clorado
4. Higienização do circuito de pasteurização	NaOH e ácido nítrico a 1,5%	NE	NE	NE	NaOH e ácido nítrico a 1,5%
5. Higienização da clarificadora	NE	NE	NE	NE	Manual com sabão em pó
6. Higienização do tanque de estocagem de leite pasteurizado	Manual com detergente neutro Circulação de sol. alcalina	NE	NE	NE	Manual com sabão em pó. Passagem de sol. Alcalina e ácida
7. Higienização do tanque de equilíbrio da empacotadeira	Manual com detergente neutro comercial Passagem se sol. alcalina	NE	NE	NE	Manual com sabão em pó. Passagem de sol. Alcalina e ácida

NE: Não existe este equipamento e/ou utensílio de ordenha na propriedade.

- Swab e/ou água residual do balão individual;
- Leite do balão individual;
- Swab do balão coletivo ou água residual;
- Leite da conexão após o balão coletivo;
- Swab ou água residual de latões;
- Leite de latões;
- Swab da lateral do tanque de expansão;
- Água residual do fundo do tanque de expansão;
- Leite antes de cair no tanque de expansão e após 10-12 horas de estocagem a 4°C;
- Swab da conexão entre o tanque de expansão e a clarificadora;
- Leite da conexão entre o tanque de expansão e a clarificadora;
- Swab e leite da clarificadora;
- Swab ou água residual do tanque de equilíbrio do pasteurizador;
- Leite do tanque de equilíbrio do pasteurizador;
- Leite (aquecido) da conexão da saída do pasteurizador em direção ao retardador;
- Swab da conexão após o retardador;
- Leite da conexão após o retardador e swab da conexão após a saída do pasteurizador (leite refrigerado) em direção ao estocador;
- Leite da conexão após saída do pasteurizador (leite refrigerado) em direção ao estocador;
- Swab ou água residual do tanque estocador de leite pasteurizado;
- Leite antes de cair e do interior do tanque estocador de leite pasteurizado;
- Água e/ou swab do tanque de equilíbrio da empacotadeira;
- Leite do tanque de equilíbrio da empacotadeira;
- Swab da embalagem após a passagem pela luz Ultra Violeta;
- Swab da empacotadeira;
- Leite empacotado;
- Swab de mangueiras dos caminhões tanques ao final do recolhimento do leite refrigerado.

2.3 Swabs

Não havendo na literatura indicações sobre a área a ser amostrada em algumas situações, determinou-se a delimitação das áreas de forma a facilitar a realização dos swabs nos diferentes pontos avaliados. Nos tetos, teteiras, mangueiras e tubulações utilizou-se uma área de 3 cm², compatível com o diâmetro das tubulações e equipamentos, e com o comprimento médio dos tetos. Nos tanques e latões utilizou-se a área de 25 cm² indicada pela literatura (BRAMLEY; MCKINNON, 1990).

Para delimitação das áreas, utilizou-se moldes estéreis de plástico flexível, desenvolvidos no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA – UEL). Os swabs foram realizados utilizando-se hastes flexíveis estéreis com pontas de nylon e caldo Lethen

para transporte, com a finalidade de neutralizar a ação de resíduos de sanitizantes. O material coletado foi transportado imediatamente em caixa térmica com gelo, ao LIPOA, onde as análises foram realizadas. Os resultados das amostras obtidas por *swabs* foram convertidos em UFC/cm².

2.4 Análise microbiológica

Para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em leite cru e água residual dos pontos estudados, utilizou-se placas de Petrifilm™ AC, conforme orientações do fabricante. Para o leite pasteurizado produzido no Brasil, não é recomendada a utilização do Petrifilm™ AC (BELOTI *et al.*, 1999 a), utilizou-se então, o tradicional plaqueamento em Ágar Padrão para Contagem (PCA), incubando-se a 35°C/ 48 horas (BRASIL, MARA, 1991-2).

Para contagem de psicotróficos utilizou-se a semeadura em superfície com alça de *Drigalski* em PCA, incubando-se as amostras a 21°C/25 horas (OLIVERIA; PARMELEE, 1976; APHA, 1992).

2.5 Análises físico-químicas

Nas amostras de leite refrigerado a 4°C no tanque de expansão das propriedades A, B, C1 e C3 e do leite pasteurizado das propriedades produtoras de leite tipo A e C (C3), determinou-se o grau de acidez, índice crioscópico, densidade e porcentagem de gordura conforme metodologia descrita no BRASIL – MARA (1981).

Para avaliar a eficiência do tratamento térmico, as amostras de leite pasteurizado foram submetidas à pesquisa de fosfatase alcalina, utilizando-se método colorimétrico através de *kit* comercial (Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil), e peroxidase, conforme metodologia descrita no BRASIL – MARA (1981).

2.6 Análise microbiológica da água das propriedades

Foram colhidas amostras de água utilizadas para higienização dos animais, nas mangueiras dos estábulos ou sala de ordenha. Colheu-se 100 mL de água em frasco âmbar estéril, acondicionados em caixa térmica com gelo e transportados ao LIPOA-UEL. Pesquisou-se a presença de coliformes totais e fecais nas amostras colhidas.

Utilizou-se para a análise inicial de todas as amostras o Petrifilm™ HS (3M Co. St. Paul, MN, EUA), que tem sensibilidade pra detectar 0,2 coliformes/mL (SOUZA *et al.*, 2001).

3 Resultados e Discussão

Os resultados das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, obtidos nos diversos pontos amostrados nas propriedades são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Os tetos dos animais constituíram importante fonte de contaminação quando considerou-se as contagens

obtidas e o total de animais ordenhados. Na propriedade C1 por exemplo, obteve-se contagens médias nos tetos higienizados de $1,3 \times 10^4$ UFC de mesófilos/cm² e $1,0 \times 10^4$ UFC de psicotróficos/cm², tanto em animais com CMT positivo como negativo (Tabela 04). Se considerarmos uma área média por teto de 50,8 cm² (FONSECA; SANTOS, 2000), obteremos contagens de aproximadamente $6,8 \times 10^5$ UFC de mesófilos/teto e $5,4 \times 10^5$ UFC de psicotróficos/teto, uma quantidade de microrganismos relevante quando considera-se um rebanho inteiro. Cousin (1982) relatou que em *swabs* de tetos de animais após a higienização, encontrou-se um grande número de microrganismos psicotróficos. Bramley e McKinnon (1990) encontraram em tetos higienizados de animais à pasto nos Estados Unidos da América (EUA), valores de mesófilos variando entre $3,1 \times 10^4$ UFC/teto e $1,4 \times 10^5$ UFC/teto, e contagens de psicotróficos entre $2,5 \times 10^3$ UFC/teto e $3,3 \times 10^3$ UFC/teto, valores inferiores aos encontrados neste trabalho. Esta maior carga microbiana nos tetos, deve estar associada às condições dos piquetes que, na maioria das vezes, apresentam grande quantidade de barro e pouco capim.

A propriedade de leite tipo A foi a que obteve uma melhor eficiência na higienização dos tetos, reduzindo em 99,52% as contagens de aeróbios mesófilos e em 99,03% as contagens de psicotróficos (Tabela 3). Este fato está relacionado à adoção da prática de *pré-dipping* que, segundo Fonseca e Santos (2000), pode determinar uma redução de até 80% na contagem bacteriana total do leite, diminuindo também as contagens de microrganismos psicotróficos. Na propriedade B, as reduções nas contagens foram de 77,54% para mesófilos e 66,67% para psicotróficos (Tabela 4). Nas propriedades de leite tipo C, as contagens de mesófilos após a higienização, foram reduzidas em 78,57% e a de psicotróficos em 70,57% (Tabela 4). Apesar de todas essas propriedades utilizarem apenas água para limpeza dos tetos, a redução nas contagens foi menor na propriedade de leite tipo B, podendo este fato estar associado a uma carga contaminante inicial maior nos tetos dos animais criados em sistema *free stall*, quando comparada com animais criados a pasto. Bramley e McKinnon (1990) relataram que nos EUA, as contagens realizadas em tetos higienizados de animais a pasto são menores que as de animais estabulados em cama de areia.

Realizou-se um experimento paralelo na propriedade C1 (dados não demonstrados), com o objetivo de verificar a porcentagem de microrganismos, em tetos higienizados que se incorpora ao leite durante a ordenha. Comparou-se as contagens de microrganismos dos tetos higienizados antes e ao final da ordenha, observando-se uma redução nos valores médios de mesófilos e de psicotróficos de 86,0% e de 96,0%, respectivamente, indicando com isto, que uma grande porcentagem de microrganismos do teto é incorporada ao leite. Mahieu (1991) relatou que a higienização inadequada aumentou em 18 vezes a contagem total do leite e em 3,6 vezes a contagem de psicotróficos. Além disso, as contagens obtidas a partir de tetos sujos desses animais, foram menores que as dos tetos higienizados inadequadamente.

Tabela 3 – Enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos (CAM) e psicrotróficos (PS) em diversos pontos da produção leiteira em uma propriedade de leite tipo A e outra de leite tipo C (microusina) na região de Londrina, PR, no período de maio de 2000 a junho de 2001.

Pontos Amostrados	Propriedade de Leite Tipo A		Propriedade de Leite Tipo C3	
	*CAM	*PS	*CAM	*PS
1. Swabs de TS	84.860	6.260	16.171	11.540
2. Swabs de TH	402	61	11.546	8.765
3. Três primeiros jatos de leite	10.315	5198	375	43
4. Segunda amostra de leite	2722	37	525	555
5. Swabs dos copos de teteiras no início da ordenha	3.423	533	4.016	2.851
6. Swabs dos copos de teteiras durante a ordenha	2.943	383	33.041	6.104
7. Swabs de BI	892	< 4	NE	NE
8. Leite de BI	9.100	4.830	NE	NE
9. Swabs de BC	408	200	NR	NR
10. Água residual de BC	< 100	60	90.000	30.000
11. Leite após conexão do BC	37.900	8.265	8.000	4.000
12. Água residual de latões	NE	NE	24.800.000	1.000.000
13. Leite de latões	NE	NE	800.000	510.000
14. Swabs da lateral do tanque de expansão	NR	NR	81	88
15. Água residual do tanque de expansão	10.375.000	2.070.000	171.050.000	26.570.000
16. Leite antes de cair no tanque de expansão (ordenha em circuito fechado)	70.000	13.000	232.500	135.750
17. Leite refrigerado após +/- 12 horas	1.990.000	2.800.000	1.880.000	5.305.000
18. Swab da clarificadora	NE	NE	923.333	2.097.222
19. Leite após clarificação	NE	NE	692.000	1.153.333
20. Água do TE do pasteurizador	41.400	24.500	100	< 100
21. Leite do TE do pasteurizador	NR	NR	800.000	765.000
22. Swabs de conexões após pasteurizador	Curva 32.600 Reta 1.483	Curva 4.483 Reta 383	Curva 138.333 Reta 183	Curva 2.366 Reta 33
23. Água residual do estocador após pasteurização	< 100	< 10	260	0
24. LP antes de cair no estocador	1.300	10	1.890	< 10
25. LP do interior do estocador	6.500	135	3.950	0
26. Água do TE da empacotadeira	35.600	4.700	< 10	0
27. Leite do TE da empacotadeira	9.165	1.660	2.945	0
28. Swabs de embalagens após passagem pela luz Ultra-Violeta	0	0	0	0
29. Leite Pasteurizado – pacote	7.420	350	728	12

TS= teto sujo; TH= teto higienizado; TE = Tanque de equilíbrio; BI = balão individual; BC = balão coletivo; LP= leite pasteurizado; NR= análise não realizada; NE= não existe este equipamento e/ou utensílio na propriedade *Os resultados referentes a swabs equivalem a contagem de UFC/cm² e os resultados referentes a água e leite equivalem a contagem de UFC/mL.

Em relação a contaminação inicial das teteiras, a propriedade C1 mostrou uma menor contaminação (Tabela 3). A prática de utilizar água aquecida a aproximadamente 100°C para higienização das teteiras, resultou em menores contagens iniciais de mesófilos e psicrotróficos quando comparada com as práticas das demais propriedades (Tabela 2). As propriedades de leite tipo A e C3 foram as que apresentaram uma maior contaminação inicial nos copos de teteiras (Tabela 3). Estas contagens maiores podem estar associadas a falhas na higienização destes equipamentos, envolvendo

concentrações de sanitizantes ou temperaturas incorretas, e/ou atraso nas trocas das borrachas dos copos das teteiras.

Quanto à contaminação das teteiras durante a ordenha, pôde-se observar que nas propriedades C1, C2 e C3, onde não se realizou nenhuma prática de higienização entre os animais (Tabelas 1 e 2), a contaminação aumentou bastante, quando comparada com a contaminação dos copos das teteiras nas propriedades A e B (Tabelas 3 e 4), que utilizaram alguma prática higiênica durante a ordenha. O aumento na contagem

Tabela 4 – Enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos (CAM) e psicotróficos (PS) em diversos pontos da produção leiteira em uma propriedade de leite tipo B e duas de leite tipo C (C1 e C2) na região de Londrina, PR, no período de maio de 2000 a junho de 2001.

Pontos	Propriedade de Leite Tipo B		Propriedade de Leite Tipo C1		Propriedade de Leite Tipo C2	
	*CAM	*PS	*CAM	*PS	*CAM	*PS
1. Swabs de TS	85.441	58.975	91.081	28.472	66.944	51.297
2. Swabs de TH	19.186	19.658	13.453	10.711	10.588	7.048
3. Três primeiros jatos de leite	16.769	16.265	23.550	668	7.052	85.610
4. Segunda amostra de leite	2.149	2.396	10.050	257	843	11.986
5. Swabs dos copos de teteiras antes início ordenha	166,5	66	11,6	8,3	733	566
6. Swabs dos copos de teteiras durante ordenha	143	33	210.000	199.399	6.960	5.000
7. Swabs de BI	9.996	3.100	NE	NE	NE	NE
8. Swabs de tubulação de saída do BC	266	516	NE	NE	NE	NE
9. Leite após conexão do BC	5.400	13.350	NE	NE	NE	NE
10. Swabs dos latões	NE	NE	NR	NR	10,8 x 10 ⁸	1,14 x 10 ⁶
11. Água residual de latões	NE	NE	78.000.000	920.000	NR	NR
12. Leite de latões	NE	NE	178.500	23.600	7.600.000	3.860.000
13. Swab da lateral do tanque de expansão	04	600	36.880	16.460	NE	NE
14. Água residual do tanque de expansão	980.000	161.500	NR	NR	NE	NE
15. Leite antes de cair no tanque de expansão	3.900	1.150	178.500	23.600	7.600.000	3.860.000
16. Leite refrigerado após +/- 12 horas	131.000	581.500	820.000	4.982.000	NR	NR

TS = teto sujo TH = teto higienizado BI = balão individual BC = balão coletivo; NR= análise não realizada; NE= não existe este equipamento e/ou utensílio na propriedade * Os resultados referentes a swabs equivalem a contagem de UFC/cm² e os resultados referentes a água e leite equivalem a contagem de UFC/mL.

de psicotróficos nos copos de teteiras nas propriedades C1, C2 e C3, variou entre 2,2 e 24.023 vezes, e na contagem de mesófilos entre 8,2 e 18.103 vezes (Tabelas 3 e 4). Na propriedade B, a imersão dos copos de teteiras em solução clorada reduziu em 50% a contagem de psicotróficos, mostrando-se mais eficiente que o enxágue dos copos com jatos de água, prática realizada na propriedade A, onde a redução foi de 28%. Já para contagem de mesófilos, as práticas adotadas nas duas propriedades apresentaram uma redução média de 14% (Tabelas 3 e 4).

O fato dos microrganismos aderirem na superfície das teteiras torna esses equipamentos pontos importantes na transmissão de mastite. Já para a qualidade do leite, apenas a contaminação inicial das teteiras tem importância, uma vez que a contaminação que ocorre durante a ordenha, é proveniente dos tetos, sendo estes a real fonte de contaminação para o leite.

Quanto aos equipamentos de ordenha, os swabs realizados nas conexões das tubulações, mostraram que, nos pontos onde há curvas, a quantidade de microrganismos é bem maior (Tabela 3). Segundo Bramley e McKinnon (1990), nestes pontos ficam retidos resíduos de leite que favorecem a multiplicação bacteriana. Da mesma forma, pontos como conexões, fundos cegos

de instalações, necessitam ser desmontadas em intervalos regulares para uma higienização eficiente. A propriedade C3, que possui uma grande extensão de tubulação (50 m) até o tanque de expansão e várias conexões curvas, apresentou uma importante contaminação do leite associada a equipamentos e tubulações mal higienizados. Nesta propriedade, as contagens do leite após a conexão do balão coletivo, foram de 8,0 x 10³ UFC mesófilos/mL e 4,0 x 10³ UFC psicotróficos/mL (Tabela 3), e ao analisarmos amostras de leite antes de cair no tanque de expansão, as contagens apresentaram um aumento de 2.906, % de mesófilos e 3.394, % de psicotróficos, deixando evidente a incorporação de microrganismos provenientes do equipamento. Desta forma, grandes extensões de tubulações e número elevado de conexões curvas devem ser evitados no planejamento das salas de ordenha e de pasteurização, devido a dificuldade de higienização destes pontos. Para Bramley e McKinnon (1990) seria necessária uma grande contaminação nos equipamentos para aumentar a contagem bacteriana do leite. Em uma produção de 1.000 L de leite, para se aumentar a contagem em 01 bactéria/mL é necessária a inclusão de 1,0 x 10⁶ microrganismos.

Na propriedade de leite tipo A, observou-se significativos aumentos nas contagens de mesófilos e psicotró-

ficos no leite colhido entre o balão coletivo e após o refrigerador em placas. Comparando-se as contagens do leite da conexão após o balão coletivo com as do leite refrigerado antes de cair no tanque de expansão, obteve-se um aumento de 185% na contagem de mesófilos e de 157,3% na contagem de psicotróficos (Tabela 3). O leite, neste segmento, entra em contato apenas com uma curta extensão de tubulação e com o refrigerador de placas, sendo este último o provável ponto de contaminação do leite.

Uma das principais fontes de microrganismos mesófilos e psicotróficos no processo de produção do leite foi a água residual dos equipamentos. Os tanques de expansão e os latões foram os principais pontos de contaminação, tanto pelas altas contagens, como pelo volume de água residual. Nos tanques de expansão, a água residual apresentou contagens de até $1,7 \times 10^8$ UFC mesófilos/mL e $2,6 \times 10^7$ psicotróficos/mL e nos latões de $7,8 \times 10^7$ mesófilos/mL e $9,2 \times 10^5$ psicotróficos/mL (Tabelas 3 e 4). Segundo Bramley e McKinnon (1990), pelo menos 10% do total de bactérias do leite são provenientes da água residual dos equipamentos.

Os latões foram os principais pontos de contaminação nas propriedades que utilizam ordenha balde ao pé (Tabelas 1 a 4). Considerando as contagens médias da água residual dos latões das propriedades estudadas, e um volume em torno de 80 mL de água em cada latão, teremos uma contaminação de $4,11 \times 10^9$ UFC de mesófilos/latão e $7,68 \times 10^7$ UFC de psicotróficos/latão utilizado. Assim, a água residual de cada latão contribuiu com uma contaminação de $1,6 \times 10^4$ UFC mesófilos/mL e de $3,0 \times 10^3$ UFC psicotróficos/mL. Quanto a contaminação da superfície dos latões, os *swabs* realizados na lateral dos latões da propriedade C2, mostraram contagens de $10,8 \times 10^8$ UFC mesófilos/cm² e $1,14 \times 10^6$ UFC de psicotróficos/cm² (Tabela 4). Desta forma, se considerarmos a área total do latão, teremos uma contaminação de 81×10^{11} UFC de mesófilos/latão e $8,6 \times 10^9$ UFC de psicotróficos/latão.

Quanto aos tanques de expansão, as contagens de mesófilos da água residual foram altas nas propriedades onde a higienização é manual (A e C3) (Tabela 3) e menores na propriedade B onde a higienização é automatizada (Tabela 4). Nestas três propriedades, encontrou-se na água residual uma frequência média de 17% de psicotróficos, em relação a contagem de mesófilos, o que não exclui os tanques de expansão como fonte de psicotróficos, uma vez que as contagens encontradas foram bastante altas. Na propriedade C1, onde não havia volume de água residual suficiente para colheita de amostras, os *swabs* da lateral deste equipamento mostraram elevadas contagens de mesófilos, quando comparadas com os *swabs* realizados nos outros tanques de expansão (Tabela 4). A frequência de psicotróficos neste equipamento foi de 44,63% em relação a contagem de mesófilos, valores maiores que os encontrados na água residual. Esta alta contaminação do tanque de expansão da propriedade C1, pode ser atribuída ao fato de a higienização com sanitizante e esponja ser realizada apenas a cada quinze dias (Tabela 2).

Os balões individuais e coletivos, não foram grandes fontes de microrganismos mesófilos ou psicotróficos exceto na propriedade C3 (microusina), onde encontrou-se um volume maior de água residual e maiores contagens no balão coletivo (Tabela 4).

A água residual dos equipamentos da sala de pasteurização da propriedade de leite tipo A, também foi fonte de microrganismos mesófilos e psicotróficos, inclusive para o leite pasteurizado (Tabela 3). Na propriedade C3, as contagens obtidas nos equipamentos foram menores do que na propriedade produtora de leite tipo A (Tabela 3), no entanto, a clarificadora mostrou-se como um ponto importante de contaminação, apresentando contagens de mesófilos de $9,2 \times 10^5$ UFC/cm² e uma frequência de 227% de psicotróficos em relação a contagem de mesófilos (Tabela 3).

Analisando-se as duas propriedades que pasteurizam leite (Tabela 1), observou-se duas situações distintas. A propriedade de leite tipo A, apesar de contar com sala de ordenha, utilizar algumas boas práticas como o pré- *dipping* e ter todo o leite canalizado (Tabelas 1 e 2), obteve um produto final pasteurizado com contagens médias de $7,4 \times 10^3$ UFC mesófilos/ml e $3,5 \times 10^2$ UFC psicotróficos/ml de leite, superiores às encontradas na microusina de leite tipo C (C3), onde as contagens de mesófilos e psicotróficos foram em média 728 UFC/ml e 12 UFC/mL, respectivamente (Tabela 3). Em ambas as propriedades as pesquisas de fosfatase e peroxidase revelaram resultados negativos e positivos respectivamente, indicando um processo de pasteurização nos parâmetros corretos de tempo e temperatura. No entanto, na propriedade de leite tipo A, a eficiência na pasteurização foi menor, em torno de 95%, apresentando também uma maior recontaminação pós-pasteurização por equipamentos higienizados inadequadamente. A partir deste trabalho, com a detecção dos pontos de contaminação, os problemas foram resolvidos e as contagens retomaram aos padrões legais.

Os resultados das análises físico-químicas das amostras de leite pasteurizado estavam dentro dos padrões determinados pela legislação.

As amostras de água das propriedades A, B e C1, provenientes dos pontos de utilização na sala de ordenha, não apresentaram contagem de coliformes, sendo próprias para utilização na higienização dos tetos, equipamentos e utensílios. Na propriedade C3, a água não clorada utilizada na higienização dos animais e de utensílios de ordenha apresentou contagens médias de 370 coliformes totais/100 mL. Na propriedade C2, que também não utiliza a cloração, a água apresentou contagens médias de 820 coliformes totais/100 mL. Nestas duas propriedades, a água mostrou ser fonte de contaminação de tetos, de utensílios de ordenha e conseqüentemente do leite produzido. Segundo Thomas (1966), a água contaminada com microrganismos psicotróficos, utilizada na higienização de utensílios e equipamentos de ordenha, pode ser a principal responsável pelo comprometimento da qualidade do leite refrigerado.

Para determinar a importância das mangueiras de coleta de leite a granel como fonte de microrganismos,

selecionou-se aleatoriamente quatro (4) caminhões tanques responsáveis pelo recolhimento de leite refrigerado. Assim que os caminhões tanque chegaram à indústria, foram realizados os *swabs* das mangueiras e os resultados mostraram contagens médias de $2,2 \times 10^7$ UFC de mesófilos/cm² e $1,8 \times 10^7$ UFC de psicotróficos/cm² de mangueira (Tabela 5). Estes resultados demonstraram que estas mangueiras, quando não higienizadas adequadamente, tornam-se importante fonte de contaminação para o leite refrigerado.

O leite de todas as propriedades, após 12 horas de refrigeração, apresentou aumentos nas contagens de psicotróficos que variaram entre 39 vezes, na propriedade C3, e 505 vezes na propriedade de leite tipo B. Esta variação deve-se, provavelmente, à diferenças na composição da microbiota psicotrófica, com maior ou menor velocidade de multiplicação a 4°C. Griffiths *et al.* (1988) compararam amostras de leite cru com contaminações iniciais de psicotróficos médias de $1,6 \times 10^4$ UFC/mL, mantidas em temperaturas de refrigeração de 2°C e 6°C. As amostras de leite estocadas por 48 horas a 2°C atingiram contagens médias de $3,5 \times 10^4$ UFC/mL e as amostras estocadas à 6°C apresentaram contagens médias de $3,0 \times 10^5$ UFC/ml, inferiores as obtidas neste estudo após uma média de 12 horas de refrigeração a 4°C (Tabelas 3 e 4). Villar *et al.* (1996), ao analisarem amostras de leite refrigerado entre 24 e 48 horas no norte da Espanha, encontraram contagens médias de psicotróficos de $4,35 \log_{10}$ UFC/mL, enquanto neste trabalho, transformando-se os dados para \log_{10} , as contagens foram maiores, variando entre 5,76 e 6,72 \log_{10} UFC/mL de leite. Já Poffé e Mertens (1988) encontraram na Bélgica, contagens médias de psicotróficos em leite refrigerado após 48 horas de $5,46 \log_{10}$ UFC/mL e Soler *et al.* (1995) na Espanha, contagens de $5,55 \log_{10}$ UFC/mL, valores estes mais próximos aos apresentados neste trabalho.

Em nosso estudo, os psicotróficos atingiram contagens entre 5×10^5 UFC/mL e $5,3 \times 10^6$ UFC/mL em apenas 12 horas de refrigeração em média, e segundo Punch *et al.* (1965), contagens de psicotróficos superiores a 5×10^6 UFC/ml são suficientes para promover alterações organolépticas sensíveis no leite. Para Mahieu (1991), contagens de microrganismos psicotróficos a partir de 10^6 UFC/mL, já permitem modificações de sabor, odor e consistência em leite e derivados.

A frequência de psicotróficos em relação a de aeróbios mesófilos encontrada por diversos autores é variável. Poffé e Mertens (1988) estudando amostras de leite refrigerado na Bélgica, encontraram 30,4% de psicotróficos em relação a contagem total de mesófilos, Villar *et al.* (1996) e Soler *et al.* (1995) encontraram na Espanha, 89,11% e 85,12%, respectivamente, e Mahari e Gashe (1990) na Etiópia, 98,1%. No presente estudo, o leite refrigerado apresentou, em todas as propriedades estudadas, uma frequência de psicotróficos superior a 100%, em relação a contagem de mesófilos. Essas frequências variaram entre 140,7%, na propriedade de leite tipo A, e 443,89% na propriedade de leite tipo B. Assim, associando-se altas contagens iniciais à capacidade destes microrganismos de crescimento e multiplicação em temperaturas baixas, em pouco tempo a contagem de psicotróficos pode ultrapassar a de mesófilos.

4 Conclusões

Nas propriedades avaliadas, os latões, tanques de expansão, tetos mal higienizados e água residual dos equipamentos e utensílios de ordenha e pasteurização foram os principais pontos de contaminação do leite na cadeia de produção. As mangueiras analisadas também mostraram-se importante fonte de microrganismos para o leite final refrigerado. Quando são utilizados latões na ordenha, este é o principal ponto de contaminação do leite e quando o sistema de ordenha é em circuito fechado, os tanques de expansão assumem este posto.

Os principais pontos de inclusão de psicotróficos são a água residual dos latões, a superfície dos latões, tanques de expansão e os tetos higienizados inadequadamente. Na linha de beneficiamento, a clarificadora é o principal ponto de contaminação.

A refrigeração do leite a 4°C tem maior eficiência quanto menor for a contaminação do leite por psicotróficos, uma vez que esta temperatura não é capaz de controlar o crescimento deste microrganismos.

Em todas as propriedades, exceto na produtora de leite tipo B, a quantidade de psicotróficos incorporada ao leite durante a produção é suficiente para comprometer sua qualidade.

A contaminação do leite por mesófilos e psicotróficos não depende do sistema de produção ou tipo de

Tabela 5 – Frequência de microrganismos aeróbios mesófilos (CAM) e psicotróficos (PS) em mangueiras de quatro (4) caminhões utilizados na colheita de leite a granel na região de Londrina, PR, no período de maio de 2000 a junho de 2001.

Amostras	CAM (UFC/cm ²)	PS (UFC/cm ²)
Caminhão 01	28.500.000	12.000.000
Caminhão 02	12.333.333	4.533.333
Caminhão 03	29.500.000	39.000.000
Caminhão 04	20.166.666	17.000.000
Média	22.624.999	18.133.333

ordemha utilizado nas propriedades, mas sim, das boas práticas aplicadas em todo o processo de produção leiteira.

Os microrganismos indicadores ideais para avaliação da qualidade microbiológica de leite refrigerado são os psicrotóxicos. A utilização da contagem de mesófilos quando não há boas práticas implantadas, pode subestimar o número real de microrganismos presentes no leite.

Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Milk and milk products. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: APHA, 1992, p.837-856.

BELOTI, V. *et al.* Evolution of physical-chemical and microbiological characteristics of pasteurized milk types commercialized in Londrina city, Paraná, Brazil. *Epidemiol. Sante Anim.*, n.311, p.4-50, 1997.

BELOTI, V. *et al.* Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. *Semina*, v.20, n.1, p.12-15, 1999.

BELOTI, V. *et al.* Frequency of 2,3,5 – triphenyltetrazolium chloride (TTC) non reducing bacteria in pasteurized milk. *Revista Brasileira de Microbiologia*, v.30, n.2, p. 137-140, 1999 a.

BRAMLEY, A.J.; MCKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk* 2.ed. London/New York: Elsevier Science Ltda, 1990. p.163-207.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Secretaria de Defesa Agropecuária. *Laboratório de Referência Animal* (MARA). Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal*- RIISPOA. Brasília, 1980.

CERQUEIRA, M.M.O.P. *et al.* Características microbiológicas de leite cru e beneficiado em Belo Horizonte (MG). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.46, n.6, p.713-721, 1994.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, v.45, n.2, p.172-207, fevereiro, 1982.

FAGUNDES, M.R. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de cinco marcas de leite tipo C produzido e comercializado na região de Toledo/PR (cadeia produtiva de laticínios Agropoldo/Oeste). In: ANAIS do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. [S.l.: s.n.], 2001. p.174.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do Leite e Controle de Mastite*. São Paulo: Lemos editorial, 2000.

FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. *Revista Higiene Alimentar*, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

GRIFFITHS, M.W. *et al.* The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. *Food Microbiology*, n.5, p.75-87, 1988.

MAHARI, T.; GASHE, B.A. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the sources of contamination in milk processing plant in Addis Ababa, Ethiopia. *Journal of Dairy Research*, v. 57, p.233-238, 1990.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche despues de su recogida. In: LUQUET, F.M. *Leche y Productos Lacteos. La leche de la Mama a la Lechería*. Zaragoza: Acribia, S.A., 1991. p. 181-226.

MUIR, D.D. The fresh- life of Dairy Products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo C e das embalagens plásticas utilizadas no envase em uma usina de beneficiamento do estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Microbiologia*, v.20, n.03, p.261-266, 1989.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo B em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 41, n.01, p.07-16, 1989.

OLIVERIA, J.S.; PARMALLEE, C.E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *Journal Milk of Food and Tecchnology*, v.39, n.04, p.269-272, 1976.

POFFÉ, R.; MERTENS, W. Rapid estimation of psychrotrophic and proteolytic bacterial counts from total bacterial counts in cooled raw milk. *Internacional Journal of Food Science and Technology*, n.23, p.379-383, 1988.

PUNCH, J.D.; OLSON, J.C.; THOMAS, E.L. Psychrophilic bacteria . III Populacion levels associated with flavor or physical change in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 48, p.1178-1183, 1965.

RODRIGUES, E. *et al.* Avaliação microbiológica de amostras de leite tipo B coletadas nas escolas estaduais do estado do Rio de Janeiro. In: ANAIS do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. [S. l.: s. n.], 2001. p.376.

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO; E.P.; TEIXEIRA, D. Influência de Microrganismos Psicrotóxicos Sobre a Qualidade do Leite Refrigerado. Uma Revisão. *Revista Higiene Alimentar*, v.12, n.55, p. 21-26, 1998.

SMITHWELL, N.; KAILASAPATHY, K. Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk: problems with shelf life. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v.50, p.28-31, maio, 1995.

SOLER, C.P.A.; DE PAZ, M.; NUÑEZ, M. The microbiological quality of milk produced in the Balearic Islands. *Internacional Dairy Journal*, v.5, p.69-74, 1995.

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

SOUZA, J.A. *et al.* Avaliação do desempenho do sistema Petrifilm™ HS e EC para enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em água. *Revista Higiene Alimentar: Resumo dos trabalhos apresentados no 6º Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos*, v.15, 82, p.73, 2001.

STADHOUDERS, J. Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Neth. Milk Dairy Journal*, v.29, p.104-126, 1975.

THOMAS, S.B. Source, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk. *Milchwissenschaft*, n.21, n. 5, p.270-275, 1966

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. Part. 1. *Dairy Industry.*, v. 38, p.11-15, 1973.

VILLAR, A. *et al.* Application of principal component analysis to the study of microbial populations in refrigerated raw milk from farms. *Internacional Dairy Journal*, v.6, p. 937-945, 1996.