

Psicotróficos e *Pseudomonas SPP.* em Leite Cru Refrigerado

Psychotropic Organisms and *Pseudomonas SPP.* Refrigerated Raw Milk

Samera Rafaela Bruzaroski^{a*}; Ítalo Benato Trento^a; Anna Laura D'Amico de Alcântara^b; Elsa Helena Walter de Santana^b

^aUnopar, Curso de Medicina Veterinária. PR, Brasil.

^bUnopar, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. PR, Brasil.

*E-mail: samera.rafaela@hotmail.com

Resumo

A conservação do leite cru sob refrigeração favorece o crescimento de psicotróficos, produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes. *Pseudomonas* spp e *P. fluorescens* são relatados como os psicotróficos de maior frequência em leite refrigerado. O objetivo foi avaliar a população de mesófilos, psicotróficos e *Pseudomonas* spp. de leite cru refrigerado (caminhão tanque), de seis diferentes municípios do Paraná, entregue ao beneficiamento. Para a pesquisa de psicotróficos utilizou-se o plaqueamento em PCA (21 °C / 25 horas), para *Pseudomonas* spp utilizou-se Pseudomonas Ágar Base com adição de CFC (Cetrimida, Fucidina, Cefaloridina) a 30° C / 48 horas e para aeróbios mesófilos utilizou-se Petrifilm™ Ac (37° C / 48 horas). Determinou-se acidez titulável (°D) e lactofermentação. A contagem de mesófilos variou de 1,7 x 10⁵ a 4,9 x 10⁶ UFC/mL e a de psicotróficos entre 8,4 x 10⁵ e 4,2 x 10⁶ UFC/mL, sem diferença significativa (p<0,05) entre os municípios. A população de *Pseudomonas* spp. variou de 7,1 x 10⁴ a 1,6 x 10⁶ UFC/mL, com diferença significativa (p<0,05) na população de pseudomonas de Cruzeiro (1,6 x 10⁶ UFC/ mL) e Campina da Lagoa (7,1 x 10⁴ UFC/mL). A população média de pseudomonas, em relação à de psicotróficos variou entre 4,12 a 90,14%, com média de 30,22%, o que indica a presença de outros gêneros psicotróficos. A acidez titulável média foi de 17°D e a lactofermentação indicou ausência de inibidores de crescimento. As contagens de psicotróficos e *Pseudomonas* spp. refletem, negativamente, na qualidade microbiológica e sensorial, tempo de vida de prateleira e valores nutricionais do leite e derivados.

Palavras-chave: Qualidade. Legislação. Mesófilo. Refrigeração.

Abstract

Conservation of raw milk under refrigeration favors psychrotrophic organisms' growth, producers of proteolytic enzymes and thermoresistant lipolytic organisms.. Pseudomonas spp and P. fluorescens are reported as the most frequent psychotropic organisms in cold milk. The objective was to evaluate the population of mesophilic, psychrotrophic and Pseudomonas spp. of refrigerated raw milk (tank truck), from 6 different localities in the state of Paraná, delivered to benefiting. For psychrotrophic organisms' research the PCA platelet was used (21 °C / 25 hours), for Pseudomonas spp Pseudomonas Ágar Base was used with added CFC (Cetrimide, Fucidina, Cephaloridine) at 30 °C / 48 hours and for aerobic mesophilic Petrifilm™Ac (37 °C / 48 hours) was used. Titratable acidity (°D) and lacto-fermentation were determined. The mesophile counts ranged from 1.7 x 10⁵ to 4.9 x 10⁶ cfu / ml and the psychrotrophic organisms between 8.4 x 10⁵ and 4.2 x 10⁶ CFU / mL, with no significant difference (p<0,05) among the municipalities. The population of Pseudomonas spp. ranged from 7.1 x 10⁴ to 1.6 x 10⁶ CFU / ml, with significant difference (p< 0,05) in the population of pseudomonas in Cruzeiro (1.6 x 10⁶ CFU / mL) and Campina da Lagoa (7.1 x 10⁴ CFU / mL) cities. The average population of Pseudomonas, in relation to psychrotrophic ones, ranged from 4.12 to 90.14% with an average of 30.22%, which indicates the presence of psychrotrophic substances from other genii. Mean titratable acidity was 17°D and lacto-fermentation indicated no growth inhibitors. The counts of psychrotrophic and Pseudomonas spp. reflect negatively on microbiological and sensory quality, time of life of shelf and nutritional values of milk and derivatives.

Keywords: Quality. Legislation. Mesophyll. Refrigeration.

1 Introdução

O mercado consumidor tem exigido produtos de origem animal de melhor qualidade e em relação ao leite e seus derivados, tal fato é também uma realidade. O leite é um alimento imprescindível e para todas as faixas etárias é considerado um alimento completo, contendo proteínas, vitaminas e sais minerais indispensáveis para o desenvolvimento e manutenção do organismo humano. Apesar de sua importância do ponto de vista nutricional, o leite pela sua composição é um excelente meio de cultivo para o desenvolvimento de micro-organismos (CALLEFE; LANGONI, 2015). Desta forma, visando a melhoria da qualidade do leite, a Resolução IN 62/2011, do Ministério da

Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2011), estabelece que o leite deve ser resfriado em tanques de refrigeração por expansão direta (temperatura igual ou inferior a 4 °C) ou tanques de imersão (temperatura igual ou inferior a 7 °C), devendo ser recolhido e transportado por caminhões isotérmicos para o laticínio em até 48 horas.

Os principais grupos de micro-organismos deteriorantes em leite são os mesófilos e psicotróficos. Aqueles que têm a temperatura ótima de multiplicação entre 25 °C e 40 °C e se multiplicam, rapidamente, quando o leite não é armazenado sob refrigeração são denominados de mesófilos. Já os psicotróficos, independentemente da sua temperatura ótima de multiplicação, são capazes de se desenvolver em

temperaturas de refrigeração, principalmente, quando ocorre o armazenamento prolongado (LANDGRAF, 1996; SANTOS *et al.*, 2013) avaliaram o crescimento de micro-organismos psicrotróficos em leite cru refrigerado armazenado a 4 °C, 7 °C e 10 °C. Após 96 horas, o crescimento médio de psicrotróficos a 10 °C foi quatro vezes maior que a 4 °C, enquanto que a 7 °C foi 3,3 vezes maior que a 4 °C, o que mostra a importância da redução de tempo e a temperatura no armazenamento do leite.

A qualidade microbiológica inicial do leite cru tem relação direta com as Boas Práticas de Ordenha e a sanidade do rebanho, e influencia o desenvolvimento dos micro-organismos psicrotróficos durante o armazenamento (ALMEIDA *et al.*, 2017). Segundo Perin *et al.* (2012), quando a contagem inicial de mesófilos aeróbios no leite cru é maior que 100.000 UFC/mL o desenvolvimento da microbiota psicrotrófica é significativamente maior do que em um leite com contagem inicial baixa.

Os psicrotróficos, quando atingem contagens de 10^6 a 10^7 Unidades Formadoras de Colônias - UFC/mL, sintetizam quantidades suficientes de enzimas termorresistentes, principalmente, lipases e proteases (COSTA *et al.*, 2002), para promover modificações no sabor, odor e consistência do leite e derivados. Como resultado a ação enzimática há perda de qualidade do produto processado e redução da vida de prateleira (JONGHE *et al.*, 2011).

Dentre os micro-organismos psicrotróficos, o mais frequentemente encontrado em leite cru refrigerado é o gênero *Pseudomonas* spp., que se caracteriza pelo rápido crescimento e intensa atividade lipolítica e proteolítica (ARCURI *et al.*, 2008; JONGHE *et al.*, 2011; CLETO *et al.*, 2012; DECIMO *et al.*, 2014; SCATAMBURLO *et al.*, 2015; MU *et al.*, 2009). A contagem total de *Pseudomonas* spp. no leite está relacionada com a temperatura e o tempo de armazenamento (NIELSEN, 2002; JONGHE *et al.*, 2010). O tempo de armazenamento nos tanques de expansão a 4 °C, aliado ao tempo de armazenamento nos silos industriais, levam ao aumento da contagem no leite presente nas indústrias. A contaminação inicial advém do manejo nas propriedades e do transporte do leite (KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; STULOVA *et al.*, 2010).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a população de mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp e a frequência deste gênero em leite cru refrigerado entregue ao beneficiamento.

2 Material e Métodos

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas do tanque de caminhões isotérmicos na plataforma de recepção da indústria beneficiadora (Londrina, Paraná, Brasil) entre 30 de março e 15 de junho de 2015. Cada amostra era constituída de 50 ml, totalizando 18 amostras de 6 diferentes municípios do Norte do Paraná, com distância média entre as propriedades rurais e a indústria de 230 km. De cada município foram

coletadas duas amostras dentro do período do estudo.

Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixa isotérmica com gelo reciclável e levadas ao laboratório de Microbiologia do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Norte do Paraná para análise imediata.

2.1 Análises microbiológicas

As diluições das amostras foram realizadas pipetando-se asepticamente alíquotas de 25 ml de cada amostra de leite cru, adicionando-se em frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina 0,85 %. Foram homogeneizadas e realizadas diluições decimais até 10^{-6} em tubos contendo o mesmo diluente (BRASIL, 2003). As diluições selecionadas foram semeadas em duplicata e os resultados foram expressos em UFC por mL.

2.1.1 Contagem de Aeróbios Mesófilos

Para a contagem de aeróbios mesófilos foi utilizado o Petrifilm™ AC (3M do Brasil Ltda). Após inoculação de 1 mL da diluição selecionada, as placas foram incubadas em temperatura de 37 °C durante 48 horas (HOUGHTBY *et al.*, 1992).

2.1.2 Contagem de Psicrotróficos

A contagem total de micro-organismos psicrotróficos foi realizada pipetando-se 0,1 mL das diluições selecionadas e realizando o plaqueamento em superfície com alça de Drigalski em Plate Count Agar (PCA), seguido de incubação em temperatura de 21 °C durante 25 horas (OLIVEIRA; PARMALLEE, 1976).

2.1.3 Contagem de *Pseudomonas* spp.

Para a enumeração de *Pseudomonas* spp. foi utilizado o meio de cultura *Pseudomonas* Ágar Base com adição de suplemento CFC (Cetrimida 5mg, Fucidina 5mg, Cefaloridina 25mg). As diluições foram plaqueadas em superfície, em alíquotas de 0,1 mL, com alça de Drigalski, sendo incubadas a 30 °C por 48 horas (FAGUNDES *et al.*, 2006).

2.1.4 Lactofermentação

Para verificar presença de resíduos de inibidores de crescimento de micro-organismos nos leites analisados realizou-se a prova da lactofermentação. Para isso, alíquotas de 10 mL de leite foram incubadas a 37 °C, por 248 horas (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006) para verificação de presença ou ausência de coágulo.

2.2 Análises físico-químicas

2.2.1 Determinação de Acidez titulável

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica foram transferidos 10 mL das amostras de leite para um béquer e, em seguida, adicionou-se 4-5 gotas da solução fenolftaleína

a 1%. Após, titulou-se com solução Dornic (0,11 N) até o aparecimento da coloração rósea por, aproximadamente, 30 segundos (BRASIL, 2006). Os cálculos para determinação da acidez titulável ocorreu por meio da seguinte fórmula:

$$V(\text{mL}) \cdot 10 = \text{Acidez}^\circ D$$

As análises foram realizadas em duplicata.

2.3 Análise estatística

Os resultados microbiológicos foram avaliados por meio da Análise de variância (ANOVA) e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) (STATSOFT, 2010).

3 Resultados e Discussão

A contagem de mesófilos variou de $1,7 \times 10^5$ a $4,9 \times 10^6$

UFC/mL com média de $9,7 \times 10^5$ UFC/mL, sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre os municípios (Quadro 1). A contagem de mesófilos média do leite cru refrigerado dos produtores esteve dentro do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa (IN) n.62 (BRASIL, 2011) que era, no período da realização das análises, de 3×10^5 UFC/mL. O produtor A não atendeu ao limite estabelecido pela IN62, bem como o valor médio do leite entregue ao laticínio beneficiador (Quadro 1). Vários fatores podem ter contribuído para elevar as contagens de mesófilos, como a não adoção de práticas higiênicas adequadas no momento da ordenha, falha na higienização e mastite do rebanho (NERO *et al.*, 2005).

Quadro 1 - Contagem média (UFC/mL) de mesófilos, psicrotróficos e *Pseudomonas* spp de amostras de leite cru refrigerado, entregues ao beneficiamento e provenientes de seis municípios do Norte do Paraná, 30 de março e 15 de junho de 2015

Municípios	Mesófilos* (UFC/mL)	Psicrotróficos* (UFC/mL)	Pseudomonas* (UFC/mL)	% <i>Pseudomonas</i> spp/psicrotróficos
(A)	$4,9 \times 10^6$ ^a	$2,2 \times 10^6$ ^a	$9,0 \times 10^4$ ^{a b}	4,12
(B)	$1,7 \times 10^5$ ^a	$1,1 \times 10^6$ ^a	$7,1 \times 10^4$ ^b	6,61
(C)	$1,9 \times 10^5$ ^a	$8,4 \times 10^5$ ^a	$3,7 \times 10^5$ ^{a b}	44,21
(D)	$2,6 \times 10^5$ ^a	$1,9 \times 10^6$ ^a	$1,6 \times 10^6$ ^a	90,14
(E)	$2,7 \times 10^5$ ^a	$2,5 \times 10^6$ ^a	$5,7 \times 10^5$ ^{a b}	22,59
(F)	$2,4 \times 10^5$ ^a	$4,2 \times 10^6$ ^a	$6,3 \times 10^5$ ^{a b}	14,86
Média dos municípios	$9,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$	30,22

*Os valores apresentados são a média de duas coletas/município. Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença entre os municípios para o mesmo micro-organismo pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

As contagens de psicrotróficos do leite apresentaram valores entre $8,4 \times 10^5$ e $4,2 \times 10^6$ UFC/mL com média de $2,1 \times 10^6$ UFC/mL, sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre os municípios. Não existe um limite máximo de micro-organismo estabelecido pela legislação (BRASIL, 2011), porém sabe-se que os psicrotróficos, quando atingem uma população entre 10^6 a 10^7 UFC/mL, como as contagens obtidas neste estudo, sintetizam lipases e proteases termorresistentes suficientes para promover alterações sensoriais no leite e derivados (COSTA *et al.*, 2002; MAHIEU, 1991; MUIR, 1996).

Pinto, Martins e Vanetti (2006) constataram que a população de psicrotróficos no leite cru refrigerado varia com o binômio tempo/temperatura e sua estocagem por períodos prolongados reflete, negativamente, na qualidade do produto final. Em condições sanitárias adequadas, as bactérias psicrotróficas representam menos de 10 % da microbiota total do leite cru e no manejo higiênico não satisfatório os micro-organismos psicrotróficos podem ultrapassar 75 % (NIELSEN, 2002). Este fato foi observado neste estudo na maioria das amostras de leite analisadas das propriedades (Quadro 1) e na contagem média do leite dos municípios, nos quais a frequência de psicrotróficos foi de 210% em relação população de mesófilos.

A população de *Pseudomonas* spp. no leite cru refrigerado entregue ao beneficiamento variou de $7,1 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^6$ UFC/mL, com contagens médias de $6,4 \times 10^5$ UFC/mL. Para este grupo de micro-organismos foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a população de pseudomonas do leite entregue pelos municípios D ($1,6 \times 10^6$ UFC/mL) e B ($7,1 \times 10^4$ UFC/mL) (Quadro 1). A alta contagem dessas bactérias no leite cru refrigerado está associada à elevada contagem inicial e intimamente relacionada com a deficiência nas práticas de higiene de ordenha, especialmente na superfície de tetos, e a qualidade da água utilizada (FAGUNDES *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida (2014), em que a contagem média de *Pseudomonas* spp. em leite cru refrigerado variou de $2,31 \times 10^4$ UFC/mL a $1,78 \times 10^5$ UFC/mL. Silva *et al.* (2010) encontraram valores superiores, sendo de $5,1 \times 10^5$ UFC/mL para o leite recém ordenhado e de $1,4 \times 10^6$ UFC/mL para o leite armazenado por 48 horas. No estudo de Fagundes *et al.* (2006), foram encontradas contagens próximas de ($1,6 \times 10^5$ UFC/mL), para propriedade com manejo inadequado, apontando a qualidade da água como fator determinante nessa contaminação.

A população média de pseudomonas no leite analisado, em relação à de psicrotróficos, variou entre 4,1 a 90,1%, com

média de 30,2% (Quadro 1). O município D teve o leite cru refrigerado com a maior população de pseudomonas entre os municípios estudados, indicando este o gênero psicrotrófico mais frequentemente isolado. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores, em que pseudomonas foi o gênero mais isolado (43%), variando de 10^2 e 10^7 UFC/mL, sendo *P. fluorescens* a espécie predominante (37,6%). (ARCURI *et al.*, 2008; FAGUNDES *et al.*, 2006; JONGHE *et al.*, 2010; KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; MU; DU; BAI, 2009; MUIR, 1996; SANTOS *et al.*, 2009). O município B foi aquele com menor população de *Pseudomonas* spp no leite cru refrigerado (Quadro 1), indicando uma possível prevalência de outros gêneros psicrotróficos como, por exemplo, *Aeromonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (SHAH, 1994; REINHEIMER *et al.*, 1990) realizaram estudos na Europa e Estados Unidos e das 321 espécies de psicrotróficos isoladas em leite, 223 eram Gram negativos, sendo que 51,1% desse total era do gênero pseudomonas.

Quanto a acidez titulável, as amostras de leite de todos os produtores apresentaram valor médio de 17°D, permanecendo dentro do parâmetro estipulado pela IN 62(BRASIL, 2011) que é de 14 a 18 °D. A prova da lactofermentação indicou ausência de inibidores de crescimento em todas as amostras.

4 Conclusão

A maior parte das amostras de leite cru refrigerado atendeu aos requisitos mínimos legais de qualidade para contagem de mesófilos e a população média de micro-organismos psicrotróficos no leite entregue para beneficiamento foi de $2,1 \times 10^6$ UFC/mL.

A população média de *Pseudomonas* spp. no leite foi de $6,4 \times 10^5$ UFC/mL, representando 30% da população total de psicrotróficos, o que indica a presença de outros gêneros psicrotróficos na microbiota do leite cru refrigerado.

As altas contagens de psicrotróficos e *Pseudomonas* spp. no leite analisado refletem negativamente na qualidade microbiológica e sensorial, tempo de vida de prateleira e valores nutricionais do leite e derivados.

Referências

ARCURI, E.F. *et al.* Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciênc. Rural*, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

ALMEIDA, K. M. *et al.* *Pseudomonas* spp. and *P. fluorescens*: population in refrigerated raw milk. *Ciênc. Rural*, v.47, n.1, p.1-6, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151540>

ALMEIDA, T.V. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leite cru nos resultados das análises eletrônicas. 2015. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, 2015.

BELOTI, V. *et al.* Leite: obtenção, inspeção e qualidade. São Paulo: Planta, 2015.

BRITO, J.R.F. *et al.* Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um

passo para a produção de leite seguro. *Acta Sci. Vet.*, v.32, n.2, p.125-131, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa 62 de 26 de agosto de 2003*. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa 68 de 12 de dezembro de 2006*. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos - Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 14 de dezembro de 2006, Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa 62, de 29 de Dezembro de 2011*. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Seção 1, 30 de Dez. 2011.

CALLEFE, J.L.R.; LANGONI, H. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. *Vet. Zootec.*, v.22, n.2, p.151-162, 2015.

CLETO, S. *et al.* Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE*, v.7, n.6, p.e40189, 2012.

COSTA, L.M. *et al.* Purificación y Caracterización de Proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.52, n.2, p.1-13, 2002.

DECIMO, M. *et al.* Characterization of gramnegative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *J. Food Sci.*, v.79, n.10, p.2081-2090, 2014. doi: 10.1111/1750-3841.12645.

DE JONGUE, V. *et al.* Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, v.196, n.3, p.318-325, 2010. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007.

FAGUNDES, C.M. *et al.* Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciênc. Rural*, v.36, n.2, p.568-572, 2006.

HOUGHTBY, G.A. *et al.* Microbiological count methods. In: MARSHALL, R.T. *Standard methods for the examination of dairy products*. Washington: American Public Health Association, 1992. p. 213-246.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: LUQUET, F.M. *Leche y productos lácteos: la leche de la mama a la lechería*. Zaragoza: Acribia, 1991. p.181-226.

JONGUE, V. *et al.* Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl. Environ. Microb.*, v.77, n.2, p.460-470, 2011. doi: 10.1128/AEM.00521-10.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *J. Appl. Sci. Res.*, v.3, n.11, p.1383-1387, 2007

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ateneu; 1996. p.109-148.

MU, Z.; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. *Eur. Food Res. Technol.*, v.228, p.725-734, 2009.

- MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 1. factors influencing raw and fresh products. *J. Soc. Dairy Technol.*, v.49, n.1, p.24-32, 1996.
- MU, Z.; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. *Euro. Food Res. Technol.*, v.228, p.725-734, 2009.
- NERO, L.A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n.1, p.191-195, 2005.
- NIELSEN, S.S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. *J. Agricul. Food Chem.*, v.50, n.22, p.6628-6624, 2002.
- OLIVEIRA, J.S.; PARMELEE, C.E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *J. Milk Food Technol.*, v.39, n.4, p.269-272, 1976.
- PERIN, L.M. et al., Interferência de temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicrotrófica, lipolítica e proteolítica de leite cru. *Semin Cienc. Agrar.*, v.33, n.1, p.333-342, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p333>
- PINTO, C.L.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C. Qualidade microbiológica de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.26, p.645-651, 2006.
- REINHEIMER, J.A.; DEMKOW, M.R. Comparison of rapid tests for assessing UHT milk sterility. *J. Dairy Res.*, v.57, p.239-243, 1990.
- SANTOS, A.S. et al. Crescimento de microorganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado. *Aliment. Nutr. Braz. J. Food. Nutr.*, v.24, n.3, p.297-300, 2013.
- SANTOS, P.A. et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos em leite cru refrigerado na macrorregião de Goiânia, GO. *Ciênc. Animal Bras.*, v.10, n.4, p.1237-1245, 2009.
- SCATAMBURLO, T.M. et al. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *J. Dairy Sci.*, v.98, n.2, p.759-764, 2015. doi: 10.3168/jds.2014-8747.
- SHAH, N. P. Psychrotrophic in Milk: a Review. *Milchwissenschaft*, v.49, n.8, p.432-437, 1994.
- SILVA, M.R. et al. Avaliação higiênico-sanitária do leite produzido em Umuarama (Paraná). B. *CEPPA*, v.28, n.2, p.271-280, 2010.
- STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 10. 2010. (Software Estatístico).
- STULOVA, I. et al. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.51, p.683-690, 2010. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02951.x.