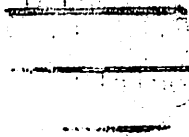


**MICROBIOTA DO LEITE PASTEURIZADO  
RESFRIADO INOCULADO COM *Pseudomonas  
fluorescens***

**ELAINE DE SOUSA SANTOS**

1998

of 1922.



**ELAINE DE SOUSA SANTOS**

**MICROBIOTA DO LEITE PASTEURIZADO  
RESFRIADO INOCULADO COM *Pseudomonas  
fluorescens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Eliana Pinheiro de Carvalho

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1998

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Santos, Elaine de Sousa.

Microbiota do leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens* / Elaine de Sousa Santos. – Lavras : UFLA, 1998.

57 p. : il.

Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Leite pasteurizado. 2. Microbiologia. 3. *Pseudomonas fluorescens*. 4. *Bacillus megaterium*. 5. Proteólise. 6. Lipólise. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.1277

-637.141

**ELAINE DE SOUSA SANTOS**

**MICROBIOTA DO LEITE PASTEURIZADO  
RESFRIADO INOCULADO COM *Pseudomonas  
fluorescens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

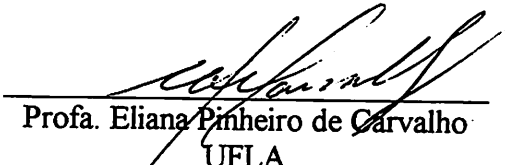
APROVADA em 31 de agosto de 1998.

Profª. Vânia Déa de Carvalho

UFLA

Prof. Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA

  
Profª. Eliana Pinheiro de Carvalho  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

**Dedico este trabalho aos meus pais, José e Maria Alice, pelo amor, carinho, incentivo e encorajamento nas horas difíceis, e aos meus irmãos pelo companheirismo e apoio. A todos vocês, muito obrigada.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele eu acredito que nada seria possível.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização do trabalho.

À professora Eliana Pinheiro de Carvalho, pela orientação, incentivo e amizade.

Aos professores Luiz Ronaldo, Luiz Carlos e Vânia Déa pelas informações passadas durante as aulas e ajuda quando solicitados.

A todos funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, em especial à Gicelda, à Eliane e ao Sr. Cipriano (Piano).

Aos colegas : Débora, Kelly, Elisângela, Geraldo, Margarita e Ivana.

A todos estagiários da microbiologia.

Um agradecimento especial à Éllen, pela ajuda e apoio durante toda a fase experimental.

Muito obrigada!

# SUMÁRIO

	páginas
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Microrganismos psicrotróficos	3
2.1.1 <i>Pseudomonas</i> spp.	5
2.1.1.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	5
2.1.1.1.1 Proteases	7
2.1.1.1.2 Lipases	11
2.1.1.1.3 Esterases	14
2.1.1.1.4 Fosfolipases	14
2.1.1.1.5 Glicosidasas	14
2.1.1.2 <i>Pseudomonas fragi</i>	15
2.1.2 <i>Bacillus</i> spp.	16
2.2 Fontes de contaminação do leite	18
2.3 Métodos alternativos de preservação do leite para o controle de bactérias psicrotróficas	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Local	28
3.2 Coleta e preparo das amostras	28
3.3 Preparo do inóculo de <i>Pseudomonas</i>	29
3.3.1 Inoculação	29
3.4 Análises microbiológicas realizadas	30



3.4.1 No leite cru	30
3.4.1.1 Contagem Total de Microrganismos Aeróbios	30
3.4.1.2 Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	30
3.4.1.3 Coliformes Totais e Fecais	31
3.4.2 No leite pasteurizado	31
3.4.2.1 Contagem Total de Microrganismos Aeróbios	31
3.4.2.2 Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	31
3.4.3 No leite pasteurizado inoculado com <i>Pseudomonas fluorescens</i> resfriado	31
3.4.3.1 Contagem Total de Microrganismos Aeróbios	32
3.4.3.2 Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	32
3.5 Provas bioquímicas dos microrganismos isolados	32
3.6 Testes para detecção de atividades lipolíticas e proteolíticas	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
4.1 Contagens microbiológicas das amostras de leite	35
4.2 Caracterização da microbiota dos leites analisados	38
4.3 Avaliação dos meios de cultura utilizados e das diferentes temperaturas empregadas	43
4.4 Atividades lipolíticas e proteolíticas apresentadas pelos principais grupos de microrganismos isolados do leite pasteurizado refrigerado	45
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>

## RESUMO

SANTOS, Elaine de Sousa. **Microbiota do leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens***. Lavras: UFLA, 1998. 57p. (Dissertação - Mestrado em Ciências dos Alimentos)\*

Foi estudada a ação de um microrganismo psicrotrófico na caracterização da microbiota do leite pasteurizado resfriado e refrigerado. O objetivo deste trabalho foi analisar a microbiota do leite pasteurizado inoculado com *Pseudomonas fluorescens* e mantido à temperatura de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  por 5 dias. Neste trabalho, realizado na cidade de Lavras, o leite tipo C cru foi pasteurizado, resfriado, inoculado com *Pseudomonas fluorescens* a uma concentração de  $\pm 10^6$  UFC/ml de leite e então armazenado a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  por 5 dias. Foram realizadas 3 repetições e as análises microbiológicas foram efetuadas também no leite cru e no leite recém-pasteurizado. Utilizou-se para as análises ágar padrão e ágar *Pseudomonas* P. As contagens microbiológicas do leite cru apresentaram-se altas ( $2,0 \times 10^7$ ,  $4,6 \times 10^6$  e  $5,4 \times 10^6$  UFC/ml). No leite pasteurizado as contagens de microrganismos viáveis foram baixas. No leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens* e refrigerado houve apenas um pequeno aumento na contagem de microrganismos durante os cinco dias de armazenagem. Para conhecer a microbiota presente nos leites analisados, foram isoladas 204 cepas de microrganismos sendo, 29 do leite cru, 11 do leite pasteurizado e 164 do leite pasteurizado resfriado inoculado com *P. fluorescens*. Na microbiota do leite cru houve predomínio de bactérias Gram positivas (cocos e bacilos esporulados e não esporulados). No leite pasteurizado também houve o predomínio de bactérias Gram positivas. No leite pasteurizado inoculado o maior grupo isolado e identificado foi de bactérias Gram positivas (bacilos esporulados) e o segundo maior foi de bactérias Gram negativas (*Pseudomonas* spp.). Nestes dois maiores grupos isolados do leite pasteurizado refrigerado foram detectadas atividades lipolíticas e proteolíticas associadas e isoladas também. O meio seletivo (ágar *Pseudomonas* P) utilizado não demonstrou seletividade para bactérias Gram negativas.

---

Comitê Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Orientadora), Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA

## ABSTRACT

SANTOS, Elaine de Sousa. **Microbial study of cooled pasteurized milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens***. Lavras: UFLA, 1998. 57p. (Dissertation - Master Program in Sciences of Foods)\*

It was studied the action of a psychrotrophic microorganism in the microbial characterization of the cooled pasteurized milk. The aim of this work was to study the microbial flora of the cooled pasteurized milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* and kept at  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  for five days. In this work, developed in Lavras (MG), the raw milk was pasteurized, cooled and inoculated with *Pseudomonas fluorescens* at concentration of  $\pm 10^6$  cfu/ml and stored at  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  for five days. Three repetitions were realized and microbiologic analysis were realized also in the raw milk C and freshly pasteurized milk. The plate count agar and Pseudomonas P agar were used for counts. The microbiologic counts of the raw milk were high in the three repetitions ( $2,0 \times 10^7$ ,  $4,6 \times 10^6$  e  $5,4 \times 10^6$  cfu/ml). In the pasteurized milk the counts of viable cells were low. In the pasteurized refrigerated milk there was scarcely growth of the present microorganisms during the five days of the storage. For to know the microbial flora in the milks were isolated 204 strains of microorganisms, of these, 29 of the raw milk, 11 of the freshly pasteurized milk and 164 of the pasteurized milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens*. In flora of the raw milk there was predominancy of the Gram positive bacteria (cocci, resistant heat and no resistant heat bacillus). In the pasteurized milk there was also predominancy of the Gram positive bacteria. In the stored refrigerated inoculated milk the biggest group isolated was Gram positive bacteria (resistant heat bacillus) and the second group was Gram negative bacteria (pseudomonas). In these two principal groups of the refrigerated milk were observed associated lipolytic and proteolytic activities and isolated too. The selective medium (Pseudomonas P agar) used didn't demonstrate its refered selectivity for Gram negative bacteria.

---

Guidance Committee: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor),  
Luis Ronaldo de Abreu - UFLA

# 1 INTRODUÇÃO

A boa qualidade do leite destinado ao consumo é fator de extrema importância visto que o leite é considerado uma das principais fontes de nutrientes para grande parte da população. Porém, devido às mesmas excelentes qualidades que nos fazem consumi-lo, também o faz um dos alimentos mais susceptíveis de sofrer alterações microbiológicas e físico-químicas.

A qualidade microbiológica do leite tem importância para a indústria, onde sofre diversos processos originando os mais variados produtos lácteos conhecidos e também para o consumidor, já que o leite pode veicular graves patógenos alimentares (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, entre outros) e, no entanto, é um alimento extremamente necessário às pessoas por ser fonte de energia, proteínas, vitaminas e minerais.

No passado, a falta de resfriamento foi responsável por alterações de sabor e desenvolvimento de alta acidez no leite cru, sendo que este problema era associado ao crescimento de estreptococos lácticos e outras bactérias mesofílicas.

No presente, o uso da refrigeração do leite, antes do tratamento térmico, eliminou a alteração devida a bactérias mesófilas, mas trouxe à tona outro sério problema: seleção de microrganismos psicrotróficos.

Algumas destas bactérias psicrotróficas são sensíveis a tratamentos térmicos, outras não. Porém, independente da bactéria ser sensível ou não a tratamentos térmicos, muitas delas produzem enzimas lipolíticas e/ou proteolíticas que são extremamente resistentes ao calor. Estas enzimas alteram as proteínas e lipídeos do leite causando posteriores alterações físicas e organolépticas no mesmo e, caso este leite seja utilizado por exemplo, para a fabricação de queijos, haverá diminuição do rendimento na fabricação do queijo e

desenvolvimento de rancificação e sabor amargo no produto acabado. Enfim, a qualidade do produto em que ocorrer estas enzimas ficará comprometida.

Embora estas bactérias representem menos de 10% da flora inicial do leite cru, elas rapidamente podem se tornar predominantes durante o período de armazenagem refrigerada, sendo muito importante, então, que o número inicial destes microrganismos seja baixo, e o controle do crescimento destes microrganismos seja bastante eficiente.

A maioria destes organismos são bastonetes Gram negativos pertencentes ao gênero *Pseudomonas spp.*, especialmente *Pseudomonas fluorescens*. Fazendo parte também deste grupo de bactérias psicrotróficas os seguintes gêneros: *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* entre outros.

Este trabalho tem por objetivo analisar a microbiota do leite pasteurizado resfriado, inoculado com *Pseudomonas fluorescens* e mantido em temperatura refrigerada; a seletividade do meio *Pseudomonas P*; e ainda verificar se os principais grupos de microrganismos isolados do leite refrigerado apresentam atividade lipolítica e/ou proteolítica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Microrganismos psicrotróficos

Segundo Collins (1981), psicrotróficos são microrganismos que podem crescer a 7°C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento. A temperatura ótima de crescimento de muitos psicrotróficos está na faixa mesofílica de 20-45°C (Bishop e White, 1986). Neste grupo de microrganismos psicrotróficos estão incluídos certos fungos e leveduras, algumas bactérias Gram positivas e algumas bactérias Gram negativas (Lyon, Sethi e Glatz, 1993).

Algumas das bactérias psicrotróficas, ao crescerem no leite refrigerado, produzem lipases e proteases extra-celulares termoresistentes. A atividade destas enzimas é muito variável, inclusive dentro de uma mesma espécie; sendo as cepas de *P. fluorescens* as que apresentam com mais frequência atividades lipolíticas e proteolíticas. Os psicrotróficos Gram negativos são destruídos pela pasteurização, mas suas enzimas não são inativadas. Os psicrotróficos Gram positivos podem não ser destruídos pela pasteurização (Grosskopf e Harper, 1974; Crielly, Logan e Anderton, 1994; Schraft et al., 1996).

Fatores ambientais como temperatura, pH e aeração influenciam a síntese de enzimas extra-celulares de psicrotróficos. Estas enzimas termoresistentes representam um problema pelo fato de hidrolizarem substâncias (proteínas e lipídeos) extremamente necessárias na indústria láctea.

As atividades lipolíticas e proteolíticas da flora psicrotrófica que cresce no leite cru contribuem significativamente em defeitos presentes em produtos lácteos, no entanto, os mecanismos de síntese destas enzimas ainda não são bem conhecidos (Jaspe et al., 1994).

Na indústria de laticínios, como em todas outras indústrias, a condição da matéria-prima é essencial para a qualidade do produto final. Sugere-se então que  $5 \times 10^6$  UFC/ml seja padrão para rejeição de leite cru, por ser considerado impróprio para o processamento e que para uma armazenagem segura do leite por 72 horas, sua contagem inicial de psicotróficos não deve exceder  $10^5$  UFC/ml (Lima,1988).

A capacidade das bactérias psicotróficas sobreviverem por longos períodos de tempo (30 dias) e produzirem altos níveis de proteases e lipases durante incubação prolongada do leite, enfatiza o potencial risco de modificação física e organoléptica do leite ou de seus derivados por estas bactérias presentes em equipamentos de laticínios inadequadamente limpos (Stead,1987).

Mesmo fazendo a assepsia adequada dos equipamentos, devido à complexidade de seus componentes, resíduos de leite associados a bactérias acabam permanecendo e tendem a acumular-se. Estas bactérias podem sobreviver muito tempo em resíduos de leite em equipamentos de ordenha e/ou em equipamentos de pasteurização ou de tratamento UHT ou em qualquer outro equipamento (Birkeland, Stepaniak e Soraugh,1985). Portanto, a permanência do leite por períodos prolongados em equipamentos inadequadamente limpos pode fornecer não apenas um alto inóculo de bactérias a este leite, mas também uma concentrada fonte de enzimas pré-formadas capazes de alterá-lo.

Os principais grupos de microrganismos psicotróficos envolvidos na alteração do leite e de produtos lácteos são as bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. e as do gênero *Bacillus* spp. que a seguir serão apresentadas.

### 2.1.1 *Pseudomonas* spp.

As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são muito importantes na alteração dos alimentos frescos refrigerados, visto que muitas de suas espécies são psicrotróficas (Jay, 1992) e dotadas de atividade lipolítica e/ou proteolítica (Siqueira, 1995).

Ternstrom, Lindberg e Molin (1993) pesquisando a flora causadora de alterações de leite cru e pasteurizado detectaram que a maioria desta microbiota era composta pelo gênero *Pseudomonas* e dentro deste gênero a espécie predominante foi *Pseudomonas fluorescens*.

#### 2.1.1.1 *Pseudomonas fluorescens*

São bacilos Gram negativos, não esporulados, aeróbios. Não são muito exigentes quanto a necessidades nutricionais. A temperatura ótima de crescimento é de 25-30°C. Hamon (1956) e Hamon et al. (1961), citados por Robinson (1987), descreveram bacteriocinas procedentes desta espécie.

Constantemente estão associadas com alteração de alimentos, principalmente nos que são refrigerados antes do consumo. Produzem alteração no leite e produtos lácteos por serem psicrotróficas e elaborarem enzimas hidrolíticas extra-celulares termoresistentes.

Segundo Robinson (1987), se o leite cru possuir uma microbiota de *Pseudomonas fluorescens* a um nível de  $5 \times 10^7$  UFC/ml a alteração ocorrerá transcorridos 10-14 dias após o tratamento UHT. Se a contagem for de  $3 \times 10^6$  UFC/ml a alteração não ocorrerá até 56 dias após o tratamento.

Além de provocarem efeitos deletérios em leite certos autores tem chamado a atenção para o envolvimento de cepas de *Pseudomonas fluorescens* na



estimulação do crescimento de *Listeria monocytogenes* (Marshall e Schimidt, 1988; Farrag e Marth, 1989) e *Escherichia coli* O157:H7 (Quinto et al., 1997).

Kornacki e Marth (1986) detectaram um efeito protetor da *Pseudomonas fluorescens* sobre a destruição térmica de *Streptococcus faecium* var. *casseliflavus*, cuja resistência térmica é considerada semelhante a do *Staphylococcus aureus* e muito maior do que a do *Streptococcus agalactiae*, patógenos que podem ocorrer no leite.

Porém nem só efeito protetor ou estimulador de crescimento oferecem cepas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas* spp. Tem sido detectado em trabalhos a capacidade que determinadas cepas tem de antagonizarem o crescimento de patógenos alimentares.

Freedman, Kondo e Willret (1989) relataram o efeito antagonístico de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* spp. isoladas de vegetais e alimentos. Uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* inibiu o crescimento das cepas de *P. phaseolicola*, *P. pisi*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi* e *Staphylococcus aureus*. Cepas de *Pseudomonas* spp., demonstraram espectro de ação contra bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Listeria* spp.) e Gram negativas (oxidase negativa), não pseudomonas. A explicação sugerida pelos autores é o envolvimento de siderophores. Siderophores são moléculas com alta afinidade por ferro e, deste modo, sequestram o ferro disponível e aumentam grandemente o conteúdo de ferro da cepa produtora e diminuindo, deste modo, o conteúdo de ferro disponível para os demais organismos presentes no meio. Sendo o ferro um componente essencial a muitos sistemas de enzimas em todas células vivas e necessário para a síntese de enzimas que contenham, ou não, o grupo heme para o crescimento de bactérias e fungos, os microrganismos produtores destas substâncias podem impedir o crescimento de outros organismos presentes no mesmo ambiente por sequestrarem o ferro disponível. A produção de

*siderophores* por *Pseudomonas* spp. pode permiti-las estabelecer populações dominantes em alimentos, especialmente em alimentos com limitada disponibilidade de ferro, como o leite (Jaspe et al.,1995).

Cheng, Doyle e Luchansky (1995) também detectaram a ação antagonística devida a *siderophores* produzidos por cepas de *Pseudomonas fluorescens* isoladas da carne. As cepas isoladas exibiram amplo espectro antimicrobiano contra patógenos Gram positivos (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativos (*Samonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* e *Campilobacter jejuni*) porém nenhum efeito foi provocado em bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus* e *Pediococcus*), bactérias que também se desenvolvem bem em meio pobre em ferro. A inibição foi relacionada à disponibilidade de ferro. Neste experimento, a atividade inibitória foi diminuída ou mesmo negativa na presença de excesso de ferro, evidenciando sua atividade quelante. Uma possível aplicação destes antimicrobianos, *Pseudomonas* spp. e/ou seus *siderophores*, é controlar patógenos alimentares em certos alimentos, particularmente alimentos fermentados por bactérias ácido-láticas, já que elas não são afetadas por eles.

As enzimas produzidas por *Pseudomonas fluorescens* envolvidas em alteração do leite e produtos lácteos são: proteases, lipases, esterases, fosfolipases e glicosidases.

#### 2.1.1.1.1 Proteases

O leite possui várias proteínas. As maiores proteínas do leite de vaca são as caseínas, as quais têm três sub-classes, incluindo a  $\alpha$ (alfa)-s-caseína,  $\beta$ (beta)-caseína e K(capa)-caseína, classificação esta de acordo com a seqüência de aminoácidos de cada uma. Quase todas as caseínas no leite recém secretado estão

contidas em um agregado de partículas denominado micela. O modelo mais amplamente aceito para a micela de caseína é que esta é formada por numerosas subunidades de  $\kappa$ -caseína mais na periferia da micela e de  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  e  $\beta$ -caseína no interior da micela. O leite possui também as proteínas do soro, as alfa-lactalbuminas e beta-lactoglobulina. Enquanto as maiores proteínas são sintetizadas na glândula mamária, várias proteínas menores são transferidas do sangue para o leite. Estas incluem as imunoglobulinas e soro albuminas.

Proteases são enzimas que agem nas proteínas causando a quebra delas em fragmentos menores. As proteases presentes no leite ou foram secretadas no leite durante a síntese deste (transferidas do sangue para o leite) ou são derivadas de bactérias ou de leucócitos (Aslam e Hurley,1996). As frações das caseínas mais susceptíveis à ação das proteases são a  $\kappa$ - e a  $\beta$ -caseína, a  $\kappa$ -caseína por ela estar localizada na periferia da micela e a  $\beta$ -caseína porque a baixas temperaturas ela se dissocia da micela, ficando portanto exposta à ação das proteases.

As enzimas proteolíticas dos microrganismos podem estar localizadas dentro da célula (intra-celular), associadas à parede celular (periplásmica) ou podem ser excretadas de dentro da célula para o meio exterior (extra-celular). A maioria das informações existentes indicam que as proteases dos psicotróficos são extra-celulares (Kohlmann et al.,1991). As enzimas associadas a células (intra-celular e periplásmica) de psicotróficos também merecem destaque, pois podem influenciar a qualidade do leite. Essas enzimas proteolíticas associadas a células podem ser liberadas dentro do leite quando as células sofrem lise, seguida de morte celular devido ao tratamento térmico.

Fairbairn e Law (1986) declararam que a maioria das proteases dos psicotróficos hidrolisam a  $\kappa$ -caseína para para- $\kappa$ -caseína, disso resultando na desestabilização das micelas de caseína e conseqüente coagulação do leite de modo análogo à ação da quimosina do coelho, e que a  $\beta$ -caseína é hidrolizada

mais rapidamente do que a  $\alpha$ -caseína. Law, Andrews e Sharpe (1977) relataram a ocorrência de gelatinização de leite UHT através da degradação da k-caseína por uma enzima produzida durante o crescimento de uma cepa psicotrófica de *Pseudomonas fluorescens*, previamente isolada de leite cru.

Não são necessárias grandes quantidades de populações psicotróficas para a produção de quantidades significantes de proteases termoresistentes (Kohlmann et al.,1991). As proteases induzem à formação de sabor amargo, pela formação de polipeptídeos de sabor amargo (com alta quantidade de aminoácidos hidrofóbicos) oriundos da hidrólise parcial das proteínas do leite, gelatinização do leite UHT esterilizado (Kumura, Mikawa e Saito,1993a) e separação do soro no leite (Anderson et al.,1981). Em queijos também há a formação do sabor amargo devido às proteases.

Kohlman et al. (1991) declararam que as proteases microbianas possuem uma estabilidade térmica notável. Resistem à pasteurização, tratamento UHT e a inativação à baixa temperatura (leite é aquecido a cerca de 55°C por 5 a 60 minutos antes do processo UHT) e estão associadas com defeitos em produtos lácteos. Dalaly e Abbo (1982) isolaram uma cepa de *Pseudomonas* de leite cru produtora de proteases que resistiram a 149°C por 10 segundos. Segundo Adams e Brauley (1981), as proteases são mais termoresistentes do que esporos bacterianos, promovendo o tratamento UHT uma redução muito pequena desta atividade enzimática.

Patel, Bartlett e Hamid (1983) analisando o comportamento de proteases extra-celulares de pseudomonas psicotróficas concluíram que elas possuíam capacidade de retenção parcial da atividade após o tratamento térmico a 120°C por 10 min.; o pH ótimo para a atividade máxima da enzima esteve na faixa de 7,2-7,4 ; metais divalentes como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  foram inibitórios à atividade da enzima, enquanto  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  tiveram pouco, ou nenhum,

efeito inibitório nas proteases, e o nível de produção da enzima foi aumentado quando as culturas cresciam em meio que continham ou caseína ou leite em pó desnatado, demonstrando que o próprio substrato da enzima tem algum efeito na indução da produção da mesma. Mckellar (1982) também obteve resultados que o levou a concluir que a produção destas enzimas pode ser induzida devido à constituição do meio de cultura. Verificou-se também a indução da produção de protease devido a aminoácidos.

Barach, Adams e Speck (1976) demonstraram que o efeito estabilizador na inativação térmica das proteases deve-se a íons divalentes. A atividade e a resistência térmica de uma protease de *Pseudomonas* sp. foi marcadamente reduzida na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cálcio e zinco foram necessários para a atividade ótima da enzima, mas apenas o  $\text{Ca}^{2+}$  restaurou o efeito protetor do leite contra a temperatura alta de inativação.

A termoestabilidade das proteases elaboradas por psicotróficos parecem estar aumentada no leite, fato este detectado através de estudos comparativos da atividade destas enzimas em leite e em soluções tampões (Uplacksh, Mathur e Malik, 1994).

A plasmina é uma protease natural do leite relativamente resistente à pasteurização e também atua na proteólise da caseína, originando problemas nos produtos lácteos (Alichanidis, Wrathall e Andrews, 1986).

Esta protease natural do leite é produzida na forma inativa de zimógeno chamada plasminogênio. A conversão de plasminogênio para plasmina ocorre através da ação específica de ativadores de plasminogênio, os quais são também proteases. A pasteurização a  $72^{\circ}\text{C}$  por 15s reduz a atividade da plasmina em apenas 10-17% e por causa disto a armazenagem do leite pasteurizado conduz a aumento da atividade da plasmina devido à inativação dos inibidores dos ativadores de plasminogênio presentes no leite. Para inibir completamente a

plasmina durante a armazenagem é necessário aquecer o leite a 142°C por 18s ou 120°C por 15 minutos (Aslam e Hurley, 1996).

Entre as várias classes de caseína, a  $\beta$ -caseína é mais susceptível à ação da plasmina, enquanto que as proteases bacterianas hidrolizam preferencialmente a k-caseína (Aslam e Hurley, 1996).

#### 2.1.1.1.2 Lipases

As lipases naturais do leite são termolábeis, sofrendo inativações de 42 e 98% a 57,2 e 72,9°C/10 segundos, respectivamente.

A membrana do glóbulo de gordura protege os triglicerídeos do leite do ataque de enzimas lipolíticas do próprio leite e das enzimas provenientes de microrganismos; enquanto é mantida a integridade do glóbulo de gordura, os triglicerídeos ficam protegidos do ataque das enzimas citadas. No entanto, após a ordenha, o leite é submetido a diferentes modificações físicas, à baixa temperatura e processos mecânicos que modificam, conseqüentemente, a integridade da membrana do glóbulo, possibilitando assim menor proteção aos triglicerídeos da ação das lipases.

Deeth e Fitz-Gerald, citados por Gomes (1988), ressaltaram que muitas lipases microbianas podem atacar o glóbulo de gordura intacto do leite, fato que não ocorre com as lipases naturais.

As lipases de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi* causam alteração no leite pela hidrólise de triglicerídeos na posição 1, produzindo então aumento de ácidos graxos livres e de glicerol. Uma das conseqüências desta atividade será notado pelo consumidor como um sabor ácido e rancificado do produto. Ácidos graxos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico e cáprico) e

também os insaturados são os primariamente responsáveis por alterações de sabor causadas por estas bactérias (Stead,1986).

Apenas uma pequena quantidade de hidrólise é necessária para que um sabor diferente seja sentido, já que o limite de ácido butírico no leite é de apenas 12,9 ppm (Anderson et al.,1981). Ácidos graxos insaturados liberados pela hidrólise podem também passar por auto-oxidação catalisada por metais a componentes que dão sabores altamente indesejáveis de “papel”, “óleo” e “metal”. As alterações causadas pela lipólise não se tornam aparentes no leite UHT antes que a população bacteriana total exceda  $10^7$  UFC/ml (Shelley, Deeth e Macrae,1986; Shelley, Deeth e Macrae,1987).

Law, Sharpe e Chapman (1976) detectaram que lipases de *Pseudomonas fluorescens* e de *Pseudomonas fragi* permaneceram totalmente ou parcialmente ativas após o tratamento térmico a  $63^{\circ}\text{C}$  por 30 min. e lipases de duas cepas estudadas permaneceram com 20-25% da sua atividade quando aquecidas a  $100^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Lima (1988) declarou que as lipases produzidas por *Pseudomonas* sp. são extremamente resistentes ao tratamento térmico  $110^{\circ}\text{C}/10$  minutos. Adams e Brawley (1981) concluíram que estas enzimas sofrem pequena inativação como resultado do tratamento UHT,  $149^{\circ}\text{C}$  por 5 a 8 segundos, que é um tratamento compatível à produção de produtos com alta qualidade.

Anderson, Hedlung e Jonsson (1979), em trabalhos experimentais, detectaram um valor D (tempo a uma determinada temperatura para que haja uma redução de 90% da atividade da enzima) para uma lipase de *Pseudomonas* de 0.7 a 1.2 min.a  $160^{\circ}\text{C}$ .

Além da resistência térmica extremamente elevada (valor D=3,6 min. a  $140^{\circ}\text{C}$  em caldo nutriente e valor D=2,0 min. a  $140^{\circ}\text{C}$  em leite desnatado), Anderson, Hedlung e Jonsson (1979) relataram que estas enzimas bacterianas apresentaram uma resistência bastante elevada à inativação química, tendo sido

apenas parcialmente inativada após 20 horas em solução de uréia 8 M, solução de hipoclorito de guanidina 6 M e duodecilsulfato de sódio 1%. O tratamento com 2-mercaptoetanol 4% também não mostrou qualquer efeito. Destes fatos, dá-se a importância da correta lavagem e assepsia dos locais ou equipamentos onde o leite resfriado fica armazenado para evitar futuras contaminações.

Segundo Anderson et al. (1981), o mecanismo desta alta resistência térmica e química ainda não é totalmente conhecido mas há, pelo menos dois fatores que, isolados ou combinados, podem ser utilizados na explicação da resistência. Primeiramente a estrutura da molécula da enzima, cujo alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos fornece uma estrutura compacta que não é desnaturada facilmente por mudanças no ambiente externo. Além disso, as pontes dissulfeto presentes têm um importante papel na estabilização da molécula e deste modo, portanto, pode explicar a alta resistência química e térmica destas enzimas. O outro fator seria a participação de componentes específicos, como polissacarídeos e cátions divalentes, que podem também estabilizar a molécula da enzima.

Kumura, Mikawa e Saito (1993b) analisando o efeito das proteínas do leite na estabilização térmica das lipases detectaram que a estabilização era principalmente derivada da  $\alpha_s$ -caseína e  $\beta$ -caseína.

A quantidade de atividade da lipase que é necessária para causar estrago em produtos lácteos depende das condições de armazenagem (tempo e temperatura) e da termoestabilidade da lipase originalmente presente, já que a maioria dos produtos são produzidos de leite tratado termicamente. Baixas atividades podem ser significantes em leite UHT (o qual é geralmente armazenado à temperatura ambiente por mais de 4 meses) enquanto que uma atividade muito mais alta seria necessária para danificar produtos refrigerados de vida de prateleira curta (Shelley, Deeth e Macrae, 1986).



#### 2.1.1.1.3 Esterases

As esterases podem, em princípio, também contribuir para a produção de ácidos graxos livres através da hidrólise de mono e diglicerídeos, responsáveis também pelo sabor rancificado (Mckay, Dieckelmann e Beacham, 1995).

#### 2.1.1.1.4 Fosfolipases

Atuam na hidrólise de fosfolipídeos facilitando a posterior ação das lipases (Marin, Mawhinney e Marshall, 1984). Cousin (1982) citou a existência de uma fosfolipase, produzida por psicrotróficos, que pode assumir um importante papel na deterioração do leite. Seu mecanismo de ação seria sobre a membrana protetora do glóbulo de gordura. Após a degradação da membrana, a matéria graxa do leite ficaria susceptível à ação das lipases.

#### 2.1.1.1.5 Glicosidases

As glicosidases produzidas por psicrotróficos são de potencial importância na vida de prateleira e maturação de produtos lácteos.

Estas enzimas extra-celulares catalisam a hidrólise de pontes glicosídicas em glicosídeos simples, oligossacarídeos e polissacarídeos, bem como em carboidratos complexos como as glicoproteínas da membrana de gordura do leite e da caseína.

Marin, Mawhinney e Marshall (1984) relataram a atividade de glicosidases de cepas de *Pseudomonas fluorescens* em substratos naturais: leite desnatado, manteiga e na membrana do glóbulo de gordura do leite.

Segundo Marin, Mawhinney e Marshall (1984) pelo fato dos microrganismos psicrotróficos também produzirem proteases, lipases e fosfolipases, há um alto potencial para um efeito cascata de degradações enzimáticas. Estas degradações, que podem conduzir finalmente à rancidez hidrolítica do leite, provavelmente começam com a ação hidrolítica combinada de proteases e glicosidases nas camadas mais externas da membrana. Quando estas camadas protetoras de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e minerais tornam-se menos compactas e resistentes, os lipídeos ficam mais acessíveis e susceptíveis para serem hidrolisados por lipases e proteases. A liberação de ácidos graxos livres podem então causar sabor e aroma desagradáveis, características da rancidez hidrolítica.

#### 2.1.1.2 *Pseudomonas fragi*

Este microrganismo é apontado como outro dos psicrotróficos Gram negativos de importância, presente, freqüentemente em laticínios (Overcast, 1968).

Alguns autores (Shelley, Deeth e Marth, 1986; Shelley, Deeth e Marth 1987) consideram a *Pseudomonas fragi* de maior importância que a *Pseudomonas fluorescens*, isto devido a resultados obtidos através de estudos comparativos entre estes dois microrganismos. Embora cepas de *P. fluorescens* sejam comumente mais isoladas do que cepas de *P. fragi*, nestes estudos realizados as cepas de *P. fragi* demonstraram ser mais importantes em relação a danos lipolíticos do que a *P. fluorescens*. Isto porque foi detectado que a *P. fragi* multiplicou-se mais rapidamente (tempo de geração cerca de duas vezes menor), causou maior aumento de ácidos graxos livres no leite, produziu lipases mais termoresistentes e demonstrou atividades maiores de lipases no leite UHT durante

armazenagem refrigerada. Enfim, as cepas de *P. fragi* demonstraram ser potencialmente mais lipolíticas do que as de *P. fluorescens*.

*Pseudomonas fragi* tem sido associada com danos a vários tipos de alimentos incluindo leite, peixes, carnes e produtos cárnicos. A incidência deste microrganismo em alimentos pode até estar sendo subestimada como resultado da falta de dados taxonômicos desta espécie segundo Shelley, Deeth e Marth (1987).

Nashif e Nelson (1953) relataram em um estudo com *Pseudomonas fragi* que a lipase dela foi produzida preferencialmente a baixas temperaturas e a produção foi praticamente nula quando estes microrganismos cresceram a 30° C ou mais.

Outro grave problema que tem sido associado a este microrganismo é a sua capacidade de fixar-se em superfícies de aço inoxidável (Zoltai et al.; Schwach e Zottola, citados por Stone e Zottola, 1985b), material mais comumente utilizado em equipamentos de laticínios. Esta capacidade deve-se à produção de filamentos de polissacarídeos por esta bactéria (Stone e Zottola, 1985a; Stone e Zottola, 1985b; Hood e Zottola, 1997). Uma vez fixada nas superfícies de contato dos equipamentos com os alimentos, a remoção delas pelos tradicionais métodos de limpeza e sanitização podem ser ineficazes (Hood e Zottola, 1997).

### 2.1.2 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* compreende bacilos Gram positivos, catalase positiva. A característica deste gênero é a formação de esporos termoresistentes de considerável importância na ecologia e taxonomia do organismo (Varnam e Evans, 1991).

Neste gênero de bactérias ocorre a associação de características extremamente maléficas à manutenção da qualidade de produtos lácteos e até mesmo à saúde do consumidor. Muitas das bactérias deste gênero são termodúricas, isto é, resistem aos tratamentos térmicos empregados para a produção de um leite de boa qualidade microbiológica; psicrotróficas; produtoras de enzimas termoresistentes a baixas temperaturas que alteram a qualidade do leite e seus derivados; e algumas delas ainda são também produtoras de toxinas.

Algumas espécies de bacilos esporulados, isolados frequentemente do leite (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, entre outros), causam estragos devido à produção de lipases e proteases. Algumas cepas (*Bacillus cereus*, *B. licheniformes*, *B.adius*, *B. subtilis*, e *B. pumilus*) podem também representar risco à saúde dos consumidores por produzirem enterotoxinas e causarem surtos de toxiinfecções (Blake e Weimer, 1997).

Grosskopf e Harper (1969) analisando o papel de psicrotróficos esporulados na vida de prateleira do leite pasteurizado concluíram que a perda da qualidade do leite foi devida ao crescimento de um microrganismo esporulado, o qual foi identificado como *Bacillus coagulans*. Os resultados sugeriram que todos os psicrotróficos esporulados sobreviveram à pasteurização (62,5<sup>o</sup>C-30min.).

Washam, Olson e Vedamuth (1977) detectaram que cepas de esporulados psicrotróficos produziram alterações no leite pasteurizado. Houve a formação de sabor e odor de fruta, azedamento, sabor amargo e coagulação doce. Teve de ser usada uma inoculação alta para a ocorrência destas alterações entre 2 e 12 dias.

Alguns pesquisadores acreditam que a contaminação do leite pasteurizado por *Bacillus* spp. resulta de esporos que estavam presentes no leite cru e sobreviveram ao processo de pasteurização. Outros acreditam que a contaminação pós-pasteurização pode contribuir significativamente para a contagem de *Bacillus* no leite pasteurizado. Te Giffel et al. (1995b) detectaram

que esporos psicrotróficos do leite cru estavam presentes no leite pasteurizado devido às suas propriedades termoresistentes

Além de sobreviverem à pasteurização, a temperatura sub-letal de pasteurização pode ativar a germinação de esporos de bactérias esporuladas, que uma vez ativados, germinarão e começarão a se dividir (Davies, 1977; Ahmed, Moustafa e Marth, 1983; Te Giffel et al., 1995b).

## **2.2 Fontes de contaminação do leite e fatores de alteração do leite pasteurizado e do UHT**

Até agora, discutiu-se a presença de microrganismos psicrotróficos no leite e os efeitos desta presença, mas a partir daqui será discutido como estes microrganismos vão para o leite. Antes porém, deve-se ressaltar a presença de fatores antimicrobianos naturais do leite.

O leite possui fatores antimicrobianos naturais específicos, imunoglobulinas e o mecanismo de fagocitose realizado por leucócitos polimorfonucleares (Robinson, 1987) e sistemas de defesa inespecíficos, entre estes fatores estão a lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e possivelmente N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (Losnedahl et al., 1996).

A capacidade antimicrobiana da lactoferrina deve-se ao fato de que a maioria dos microrganismos necessitam de ferro para o seu crescimento e a lactoferrina diminui a quantidade de ferro disponível no meio. Esta glicoproteína ligada a ferro, que em estado natural encontra-se apenas parcialmente saturada com ferro (5-30%), é um quelante de ferro. Tem sido mostrado que a lactoferrina natural é bacteriostática contra uma ampla faixa de microrganismos Gram negativos que requerem altas quantidades de ferro para o crescimento e também contra algumas bactérias Gram positivas.

A propriedade antibacteriana do sistema lactoperoxidase é baseada na inibição de enzimas metabólicas vitais bacterianas através da oxidação por hipotiocianato. A lactoperoxidase sozinha não tem nenhuma atividade antibacteriana, no entanto, junto com o peróxido de hidrogênio e tiocianato, distribuídos naturalmente em tecidos animais e humanos, formam um potente sistema antibacteriano natural denominado sistema lactoperoxidase. O hipotiocianato, produto que possui vida curta, é formado através de reação entre o peróxido de hidrogênio e o tiocianato, reação esta catalisada pela lactoperoxidase.

A lisozima mata a bactéria promovendo a ruptura de pontes glicosídicas entre dois componentes de peptidoglicana, constituinte da parede celular bacteriana. Geralmente, funciona em associação com a lactoferrina ou com imunoglobulina A.

N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAGase) é uma enzima cuja atividade tem sido implicada como um indicador de danos a tecidos durante a mastite e também há indícios que esteja envolvida em funções antimicrobianas, pode estar envolvida em proteção contra mastite e contra o crescimento bacteriano após a ordenha (Losnedahl et al., 1996).

No entanto estes sistemas antimicrobianos naturais não são suficientes para a manutenção da qualidade microbiológica do leite.

O leite de um animal sadio ao deixar o úbere possui poucos microrganismos, mas a partir do próprio ato de ordenha o leite já começa a ser contaminado.

As fontes de contaminação do leite podem ser : ambientais, infecções no úbere, toda a linha de utensílios e equipamentos em que o produto entra em contato durante ordenha, transporte e beneficiamento, sendo também fonte de

contaminação o pessoal responsável pela ordenha (Machado,1975; Varnam e Evans,1991).

Após a ordenha, o leite é exposto a contaminações ambientais provenientes da superfície externa do animal e esta contaminação é bastante variada, contendo germes do esterco, do solo, da água e saprófitas da pele. O ar também pode contribuir para a contaminação através da poeira contendo detritos do solo, esterco, rações, etc.

A qualidade da água utilizada para lavagem de utensílios, equipamentos, úbere, etc, é também de grande importância, visto que pode contribuir na contaminação de psicotróficos, como pseudomonas, acromobactérias, etc.

Dentro da indústria láctea, as fontes são a água utilizada, equipamentos de pasteurização, utensílios inadequadamente limpos e até mesmo o ar é apontado como fonte de contaminação de psicotróficos (Overcast,1968).

Os equipamentos utilizados na ordenha e transporte do leite como ordenhadeiras mecânicas, baldes, latões, carros tanques, etc, constituem importante fonte de contaminação, principalmente se houver deficiência na higienização e manutenção dos mesmos. Ordenhadeiras mal higienizadas oferecem condições para o crescimento de microrganismos que são levados para o leite, constituindo contaminações maciças. Além disto, os microrganismos da ordenhadeira podem migrar para o interior do úbere e constituir contaminações mesmo em leite ordenhado assepticamente (Machado, 1975).

Machado (1995) alerta para o fato de que latões mal higienizados pioram três vezes a qualidade do leite; linhas mal higienizadas aumentam em nove vezes a carga microbiana do leite. A limpeza do tanque onde o leite fica armazenado e resfriado é de extrema importância e se mal realizada pode aumentar em cem vezes a carga microbiana.

Muitos gêneros de bactérias, isoladas de equipamento de ordenha contaminados, têm a capacidade de fixarem-se em superfícies de borracha, vidro e aço inoxidável.

Mckinnon e Pettipher (1983) analisando as possíveis origens de bactérias termoresistentes do leite desde a fazenda até o processamento concluíram que a principal fonte de psicrotóxicos esporulados foi a superfície do úbere das vacas, estas eram contaminadas com microrganismos provenientes do solo e estes não eram totalmente removidos durante a lavagem do úbere, ganhando acesso ao leite durante a ordenha.

Te Giffel et al. (1995b) detectaram que a maior fonte de *Bacillus cereus* na fazenda encontrava-se no solo e nas fezes dos animais. No inverno, quando o gado está confinado, a forragem pode também ser responsável por alguma contaminação.


A contaminação do leite, devido a infecções no úbere, se deve ao fato do animal possuir mastite subclínica não detectada ou infecção assintomática (Varnam e Evans, 1991).

O pessoal da ordenha pode contaminar o leite através da transferência direta de pessoas doentes para o leite ou transferência indireta de pessoa doente via contaminação de equipamento de ordenha.

Galbraith e Pusey (1984), citados por Varnam e Evans (1991), afirmam que é difícil avaliar a relativa importância do pessoal da fazenda como uma fonte de contaminação do leite, mas esta sem dúvida ocorre. Em fazendas onde os trabalhadores tomam leite não pasteurizado, ciclos de infecção e reinfecção podem ser estabelecidos.

Grande interesse há sobre manutenção da qualidade de leite e produtos lácteos pasteurizados, tratamento térmico a baixas temperaturas (HTST) e do leite UHT.





Segundo Machado (1995), para a obtenção e consumo de leite pasteurizado de boa qualidade, são necessárias pelo menos três condições essenciais : leite de boa qualidade em nível de produção; tratamento adequado na indústria, com instalações, equipamentos e controle técnico de alto padrão; e boa distribuição, com refrigeração adequada, desde a usina até o momento do consumo.

Os principais fatores que afetam a qualidade do leite pasteurizado são a qualidade do leite cru, a severidade do tratamento térmico, contaminação pós-pasteurização e temperatura e tempo de armazenagem. Destes fatores, o que têm recebido maior atenção é a contaminação pós-pasteurização e é considerado o fator que mais limita a vida de prateleira na maioria dos casos.

Schroder (1984) analisando fontes de contaminação pós-pasteurização do leite pasteurizado em um laticínio, detectou que a maior fonte de contaminação pós-pasteurização do leite foi o sistema de envase dos frascos, no entanto, não houve definição se esta contaminação foi devida ao ar, mesmo usando o sistema a vácuo de enchimento, ou ao contato do equipamento com uma série de garrafas lavadas e possivelmente manipuladas com as mãos.

No leite pasteurizado, os estragos se dão ou pela presença de bactérias Gram negativas que recontaminaram o leite após o tratamento térmico, ou pela presença de enzimas termoresistentes ou por organismos Gram positivos esporulados, especialmente *Bacillus* spp., que sobrevivem à pasteurização. No leite pasteurizado, a presença das *Pseudomonas* é associada à contaminação pós-pasteurização.

Brown et al., citados por Schroder e Bland (1984), declararam que em leites pasteurizados, manipulados assepticamente, a perda da qualidade devida à pasteurização em temperaturas mais elevadas é geralmente atribuída à ativação térmica de esporos bacterianos.

Schroder e Bland (1984) analisando o efeito da temperatura de pasteurização na qualidade do leite integral detectaram que uma temperatura mais alta na pasteurização pode de fato acelerar o crescimento bacteriano neste leite, porém não se sabe se este efeito é devido à ativação térmica de esporos bacterianos ou destruição de sistemas antimicrobianos naturais presentes no leite ou as duas conjuntamente.

Segundo Jaynes-Williams e Franklin, citados por Silva (1991), o número de microrganismos esporulantes termófilos no leite pasteurizado é maior do que no leite cru devido à contaminação adicional dos equipamentos, sugerindo a possibilidade destes microrganismos constituírem um índice do estado de sanidade da linha de produção. Hull et al. (1992) detectaram que a fonte de psicrotróficos termoresistentes era o equipamento de processamento do leite.

Varnam e Evans (1991) declararam que os problemas do leite UHT são devidos a enzimas proteolíticas termo-estáveis derivadas de bactérias psicrotróficas que cresceram no leite cru.

Mohamed e Bassete (1979) citam que vários fatores acarretam falhas na fabricação de queijos, incluindo a presença de bactérias psicrotróficas, períodos prolongados de armazenagem do leite cru, variações de temperatura durante transporte, armazenagem e baixa quantidade de sólidos totais no leite (baixa quantidade de proteína-após dar cria e/ou quando as vacas estão voltando para a pastagem).

Cromie (1992) aponta para o controle de bactérias psicrotróficas as seguintes medidas: adequada sanitização e limpeza de equipamentos, boas práticas higiênicas na manipulação do leite, resfriamento rápido e adequado, manutenção de baixas temperaturas, mínimo período de armazenagem do leite cru, termização do leite cru, embalagem em atmosfera controlada ou modificada, ativação do sistema lactoperoxidase. Hull et al. (1992) apontaram para o controle de bactérias

psicrotróficas o incentivo do pagamento do leite por qualidade e melhoramento nos processos de manufatura.

### **2.3 Métodos alternativos de preservação do leite para o controle de bactérias psicrotróficas**

É de extrema importância a necessidade de controlar o crescimento de microrganismos psicrotróficos no leite para evitar a deterioração da qualidade do mesmo e de seus derivados. Com este propósito, novas técnicas de preservação do leite e dos produtos lácteos, além das comumente empregadas (higienização e controle de matérias-primas), têm sido pesquisadas.

Mistry e Kosikowski (1985) analisaram a influência de sorbato de potássio e peróxido de hidrogênio nas bactérias psicrotróficas do leite. A adição do sorbato de potássio, sozinho na concentração de 0,75% ou combinado com 0,05% de peróxido de hidrogênio, inibiu o crescimento bacteriano em leite pasteurizado e aumentou a vida útil em mais de 26 dias a 6,8°C.

O tratamento do leite cru refrigerado com dióxido de carbono está sendo pesquisado como um meio para estender o tempo de armazenagem deste produto através da inibição do crescimento de bactérias psicrotróficas e outros grupos bacterianos. O tratamento consiste de adição de CO<sub>2</sub> em leites a serem estocados refrigerados em intervalos de 24h para ajuste do pH do meio para a faixa de 6,0 a 6,2. O método tem se mostrado eficaz neste propósito e, o mais importante, provoca efeitos deletérios mínimos nas propriedades bioquímicas e sensoriais do leite, o que o torna aceitável na preservação do leite (Ruas-Madiedo et al., 1996).

O dióxido de carbono, na concentração de 10 a 30 mM (King e Nagel, 1967; Roberts e Torrey, 1988), é adicionado ao leite a ser estocado

refrigerado, porém, antes do processo térmico de pasteurização, o produto tem de ser desgasificado (aquecimento do leite sob pressão reduzida) para a retirada do CO<sub>2</sub>, pelo fato do leite vir a apresentar sabor indesejável caso este produto permaneça e tem que ter o pH aumentado para que não ocorra a coagulação do leite (Sierra et al., 1996). As bactérias Gram negativas mostram-se mais sensíveis a este tratamento do que as Gram positivas.

Segundo Ruas-Madiedo et al. (1996), os resultados mostram que a capacidade inibitória do CO<sub>2</sub> foi maior em leite com baixa qualidade microbiológica do que no de alta qualidade; a ação inibitória contra psicrótróficos proteolíticos foi mais eficiente em pH 6,0; as caseínas e proteínas do soro não foram afetadas pelo tratamento com CO<sub>2</sub> e pasteurização; os ácidos orgânicos (orótico, cítrico, úrico, fórmico, acético, propiônico e hipúrico) não tiveram suas concentrações alteradas após o tratamento, armazenagem resfriada e pasteurização; o conteúdo de ácido láctico permaneceu constante no leite com o tratamento, enquanto aumentou fracamente no leite controle; menores quantidades de compostos voláteis foram encontradas no leite tratado e a avaliação sensorial revelou que não houve diferenças de aceitação entre o leite tratado e o leite controle.

Sierra et al. (1996) estudando o efeito do tratamento do leite com CO<sub>2</sub> sobre algumas vitaminas do leite de vaca, detectaram que não ocorreram variações significativas no conteúdo total de todas trans-retinol, beta caroteno,  $\alpha$  e  $\gamma$ -tocoferol e riboflavina; houve uma fraca redução da quantidade de tiamina durante a armazenagem de sete dias do leite e a concentração de 13-cis-retinol dobrou durante os quatro primeiros dias. Todas estas variações foram também detectadas no leite controle, podendo então ser concluído que este tratamento não causou mudanças na retenção de vitaminas durante a armazenagem refrigerada. Também detectaram que houve inibição significativa da contagem de

psicotróficos no leite com o tratamento depois de 2 a 3 dias após a armazenagem e não houve diferença significativa entre a acidificação do meio com CO<sub>2</sub> a pH 6,0 ou 6,4.

A possibilidade de desenvolver a embalagem do produto em atmosfera modificada para estender a vida de prateleira dos produtos pericíveis, entre estes a do leite, foi analisada (Hendricks e Hotchkiss, 1997). Elevada atmosfera de CO<sub>2</sub> e atmosfera diminuída de O<sub>2</sub> pode aumentar a segurança da qualidade de alimentos porque reduz a respiração, atividade metabólica e, conseqüentemente, o crescimento bacteriano. A embalagem em atmosfera controlada suprime o crescimento de organismos psicotróficos que deterioram alimentos e também o crescimento de psicotróficos patogênicos, como a *Listeria monocytogenes*.

Hendricks e Hotchkiss (1997) analisaram o efeito de CO<sub>2</sub> no crescimento de monoculturas de *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria monocytogenes* em caldo nutriente tamponado em situações que pH, O<sub>2</sub> e a composição da atmosfera (20% de O<sub>2</sub>) foram mantidas constantes e concluíram que o CO<sub>2</sub> inibiu o crescimento de ambas as bactérias, mas o efeito foi maior sobre a *Pseudomonas fluorescens*.

Adições de culturas não-*starter* ácido-láticas também tem sido utilizadas para a preservação de alimentos, devido ao fato de algumas destas bactérias produzirem bacteriocinas, moléculas de proteínas que exercem um efeito de ação bactericida em bactérias susceptíveis (Lyon, Sethi e Glatz, 1993). A susceptibilidade de uma cepa à atividade da bacteriocina pode depender de vários fatores, como a presença de receptores específicos de bacteriocina na parede celular, a força de associação da molécula de bacteriocina com o receptor e a presença de moléculas-alvo apropriadas no interior da célula. Neste sentido, lactococos e espécies de *Propionibacterium* têm sido utilizadas devido às propriedades antimicrobianas de suas bacteriocinas.

A ativação do sistema lactoperoxidase é outro método alternativo de conservação do leite e na literatura é indicada para o controle de bactérias psicrótróficas e de mesófilas. Na China, devido à falta de equipamento de resfriamento, cientistas ensinaram aos fazendeiros a ativarem o sistema lactoperoxidase no leite cru a fim de preservar a qualidade do mesmo. A adição de uma pequena quantidade de tiocianato de sódio e percarbonato de sódio ao leite cru fresco é efetivo na redução de danos ao leite. Além disto, o método é barato, não possui efeitos prejudiciais ao leite ou alteração de sabor (Losnedahl et al.,1996). Cromie (1992) recomendou a ativação do sistema para conter o crescimento de bactérias psicrótróficas.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local

O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-M.G.

### 3.2 Coleta e preparo das amostras

Durante o período de 3 semanas foram coletadas 3 amostras de leite tipo C cru, 100 litros cada, provenientes de uma fazenda do município de Lavras (MG) imediatamente após a ordenha em latões de leite não esterilizados e sem prévio resfriamento.

O leite foi conduzido ao laboratório de Laticínios do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA, onde foi submetido à pasteurização em pasteurizador de placas à 72°C por 15 segundos. Logo após a pasteurização, as amostras foram subdivididas em quatro lotes, sendo o primeiro utilizado como testemunha e os outros 3 resfriados a 4±1°C e inoculados com 10<sup>6</sup> UFC/ml de *Pseudomonas fluorescens*. Posteriormente, foi feito o armazenamento das mesmas por 24, 72 e 120 horas a 4±1°C.

Após a inoculação das amostras, foi efetuada uma contagem do número de microrganismos presentes nas mesmas.

### 3.3 Preparo do inóculo de *Pseudomonas fluorescens*

A cultura de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 foi adquirida da coleção de culturas da Fundação Tropical André Tosello em Campinas-S.P., na forma liofilizada. A cultura estoque foi mantida a 4°C em Brain Heart Infusion Agar inclinado.

A suspensão bacteriana foi preparada com o cultivo em caldo nutritivo (TSB-Oxoid) por 24 horas à temperatura de 25°C, a seguir as células sofreram 3 lavagens sucessivas em solução salina 0,85% e centrifugadas a 5.000g por 10 minutos. Após a última lavagem, desprezou-se o sobrenadante, houve a ressuspensão das células em água peptonada 0,1% até uma turbidez ajustada espectrofotometricamente (espectrofotômetro Beckman DU640B) para uma absorbância inicial de 0,5 em 620 nm (Gobbetti e Rossi,1992).

Foram efetuadas diluições e estas foram plaqueadas em ágar nutritivo (PCA). Relacionando-se a medida em absorbância da suspensão e o número de microrganismos contidos na mesma, traçou-se uma curva padrão que foi utilizada para o cálculo do número de células a serem inoculadas nas amostras.

#### 3.3.1 Inoculação

Foi inoculado em média uma concentração de aproximadamente 10<sup>6</sup>UFC/ml de *Pseudomonas fluorescens*, concentração esta determinada por meio espectrofotométrico como descrito anteriormente.



### 3.4 Análises microbiológicas realizadas:

#### 3.4.1 No leite cru

Foram realizadas as seguintes contagens : Contagem Total de Microrganismos aeróbios mesófilos, Contagem de *Pseudomonas* e Coliformes Totais e Fecais segundo métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Marshall,1992).

##### 3.4.1.1 Contagem Total de Microrganismos Aeróbios

O meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (PCA). As placas foram incubadas por 48 horas a 55°C para a contagem de microrganismos aeróbios termófilos; 48 horas a 32°C para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e 10 dias a 5-7°C para a contagem de microrganismos aeróbios psicrotroficos.

##### 3.4.1.2 Contagem de *Pseudomonas* spp.

Para esta contagem foi utilizado o ágar *Pseudomonas* P (Merck). As placas foram incubadas a 48 horas a 32°C para a contagem de microrganismos mesófilos.

### 3.4.1.3 Coliformes Totais e Fecais

A contagem de coliformes totais foi realizada em caldo Lauryl Sulfato Triptose e a contagem de coliformes fecais em caldo EC, utilizando-se das temperaturas de 35-37°C/24-48 horas e 44,5°C/48 horas.

### 3.4.2 No leite pasteurizado

As análises microbiológicas realizadas foram as seguintes: Contagem Total de Microrganismos Aeróbios, Contagem de *Pseudomonas* spp. e Contagem de Microrganismos Psicotróficos.

3.4.2.1 Contagem Total de Microrganismos Aeróbios- como já descrito no item 3.4.1.1.

3.4.2.2 Contagem de *Pseudomonas* spp.- como já descrito no item 3.4.1.2.

### 3.4.3 No leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens*

As análises microbiológicas realizadas foram: Contagem Total de Microrganismos Aeróbios e Contagem de *Pseudomonas* spp.

3.4.3.1 Contagem Total de Microrganismos Aeróbios - como já descrito no item 3.4.1.1.

3.4.3.2 Contagem de *Pseudomonas* spp. - como já descrito no item 3.4.1.2.

### 3.5 Provas bioquímicas das colônias isoladas

Dos meios utilizados (Ágar *Pseudomonas* e PCA) foram selecionadas 5 colônias por placa que posteriormente foram transferidas para ágar inclinado (PCA), cobertas por óleo mineral estéril a fim de serem guardadas para posteriores purificações e identificação.

Após a purificação, realizou-se a coloração de Gram e os testes de catalase (Sneath et al., 1986) e oxidase (Macfaddin, 1980) das colônias puras.

As colônias que apresentaram características morfológicas na coloração de Gram de bastonetes Gram positivos foram submetidas à coloração de esporos (Ribeiro e Soares, 1993), após suas colônias terem crescido 24 horas a 30°C em caldo BHI e submetidas a choque térmico de 80°C por 10 minutos.

Os microrganismos isolados foram identificados por técnicas citadas por MacFADDIN (1980), Varnam e Evans (1991), Siqueira (1995) e Silva, Junqueira e Silveira (1997).

Cocos Gram positivos, catalase positiva e oxidase negativa: teste de crescimento em NaCl 10%, teste de crescimento em NaCl 15%, teste de oxidação/fermentação da glicose, teste de fermentação do manitol e da glicose, teste de coagulase e teste de Dnase.

Cocos Gram positivos, catalase negativa e oxidase negativa. Foram realizados os seguintes testes: crescimento em NaCl 6,5%, crescimento a 10°C, crescimento a 45°C e crescimento em pH 9,6.

Bastonetes Gram positivos, formadores de esporos, catalase positiva e oxidase positiva: Foram realizados os seguintes testes: fermentação de carboidratos (glicose, manitol, xilose, arabinose, salicina), teste de Voges-Proskauer (VP), teste de urease, teste de redução do nitrato, teste de crescimento em NaCl 7%, teste da hidrólise da gelatina a 22°C, teste de citrato, teste de oxidação/fermentação da glicose, teste da formação do indol, teste da hidrólise do amido e teste da motilidade.

Bastonetes Gram positivos, não formadores de esporos, catalase positiva e oxidase negativa: Foram realizados os seguintes testes: fermentação de carboidratos (maltose, salicina, trealose, glicose, sacarose e manitol), teste de hidrólise da gelatina, teste de oxidação/fermentação da glicose, teste de Voges-Proskauer e teste de arginina.

Bastonetes Gram negativos, catalase positiva e oxidase positiva: foram utilizados os sistemas API 20 NE (Biolab) e o Bac Tray III (Difco).

Bastonetes Gram negativos, catalase positiva e oxidase negativa: foram utilizados os sistemas API E (Biolab) e o Bac Tray I e II (Difco).

### **3.6 Testes para a detecção de atividades lipolíticas e proteolíticas**

A prova de proteólise foi realizada em PCA acrescido de 1% de leite em pó desnatado. Na prova de lipólise foi utilizado o meio PCA acrescido de 1% de tributirina (Marshall, 1992).

Estes meios eram vertidos em placas e após a secagem dos mesmos em estufa, eram estriadas colônias purificadas a fim de verificar se as mesmas possuíam atividades proteolíticas e/ou lipolíticas. A detecção das atividades era realizada através da formação de halos transparentes ao redor das colônias após 24 horas de incubação a 30°C.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Contagens microbiológicas das amostras de leite

Os resultados das análises realizadas nas amostras de leite cru, leite pasteurizado sem inoculação e nas de leite pasteurizado resfriado e inoculado com *Pseudomonas fluorescens* encontram-se nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1 Médias das contagens realizadas nos leites crus e pasteurizados sem inoculação

Amostras (leite)	Amostragem (semana)	Mesófilos Totais	Psicrotróficos	<i>Pseudomonas</i>
Cru	1ª	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$2,2 \times 10^6$
	2ª	$4,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$
	3ª	$5,4 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
Pasteurizado (s/ inóculo)	1ª	0	0	0
	2ª	$2,6 \times 10^2$	0	$2,2 \times 10^2$
	3ª	$4,7 \times 10^2$	0	0

As contagens no leite cru apresentaram-se bastante altas nas três repetições do experimento.

No leite pasteurizado pode-se observar que todas as contagens encontram-se dentro do limite permitido pela Legislação que é de  $8,0 \times 10^4$  UFC/ml (Silva, Junqueira e Silveira, 1997). Na maioria das amostras não foram detectados microrganismos viáveis, o que pode ser explicado por terem sido feitas as análises dentro de um curto prazo após a pasteurização, prática esta citada por Boyd,

Smith e Trout (1953) e Bishop e White (1986) como não muito recomendada, pois deve-se esperar um certo período para que ocorra a reativação enzimática dos microrganismos sobreviventes. O número de contaminantes em um leite recém-pasteurizado pode não ser suficiente para detectar a contaminação, os microrganismos sobreviventes podem estar em números tão pequenos que a contagem não consegue detectá-los. Como nesta pesquisa haveria a necessidade de se fazer inoculações nas amostras, as contagens tiveram que ser realizadas imediatamente após a pasteurização.

Através da tabela 2 pode-se notar que o leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens* não apresentou um aumento significativo na população bacteriana durante os cinco dias de armazenagem nas três repetições realizadas. Foi observado o aumento de apenas um ciclo log, levando em consideração a quantidade de bactérias inoculadas, o que talvez possa ser explicado pela ocorrência de uma fase lag pronunciada devida a uma dificuldade de adaptação das bactérias inoculadas às condições do experimento.

Tabela 2 Médias das contagens totais realizadas nos leites pasteurizados inoculados com *Pseudomonas fluorescens*

Amostragem (Semana)	Armazenagem (Dias)	Mesófilos Totais	Psicrotróficos	<i>Pseudomonas</i>
1ª	0	4,2x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	4,0x10 <sup>5</sup>
	1	6,3X10 <sup>5</sup>	4,6X10 <sup>5</sup>	3,1X10 <sup>5</sup>
	3	2,6X10 <sup>6</sup>	5,9X10 <sup>5</sup>	1,9X10 <sup>6</sup>
	5	3,1X10 <sup>6</sup>	1,3X10 <sup>6</sup>	2,5X10 <sup>6</sup>
	2ª	0	7,7X10 <sup>5</sup>	7,2X10 <sup>5</sup>
2ª	1	1,6X10 <sup>6</sup>	1,2X10 <sup>6</sup>	1,2X10 <sup>6</sup>
	3	3,1X10 <sup>6</sup>	1,5X10 <sup>6</sup>	1,9X10 <sup>6</sup>
	5	4,5X10 <sup>6</sup>	3,0X10 <sup>6</sup>	3,6X10 <sup>6</sup>
	3ª	0	8,7X10 <sup>5</sup>	7,5X10 <sup>5</sup>
3ª	1	1,7X10 <sup>6</sup>	1,7X10 <sup>6</sup>	1,4X10 <sup>6</sup>
	3	4,0X10 <sup>6</sup>	3,4X10 <sup>6</sup>	4,3X10 <sup>6</sup>
	5	5,2X10 <sup>6</sup>	3,9X10 <sup>6</sup>	4,5X10 <sup>6</sup>

As contagens de microrganismos termófilos foram muito baixas e por isso desprezadas.

Os números mais prováveis de coliformes totais nas amostras de leite cru da primeira, segunda e terceira semana foram de 7,5; 140 e 45/ml e os de coliformes fecais foram 4,5; 140 e 0,9/ml, respectivamente, e a presença destas bactérias indicam práticas de higiene e sanificação inadequadas e provável contaminação fecal.



## 4.2 Caracterização da microbiota dos leites analisados

Após as contagens totais e de *Pseudomonas* spp. foram isoladas e identificadas 204 cepas de microrganismos. Destas cepas, 29 foram isoladas do leite cru, 11 do leite pasteurizado e 164 do leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens*.

A figura 1 mostra as porcentagens dos grupos microbianos identificados no leite cru. Pode-se verificar o predomínio de cocos Gram positivos (52% das colônias identificadas), presença de bacilos esporulados (21%) e de bacilos Gram positivos não esporulados.

Os cocos Gram positivos foram representados por *Enterococcus* e *Staphylococcus* sp. e os bacilos esporulados representados por *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus* sp. Houve uma presença muito pequena de bastonetes Gram negativos.

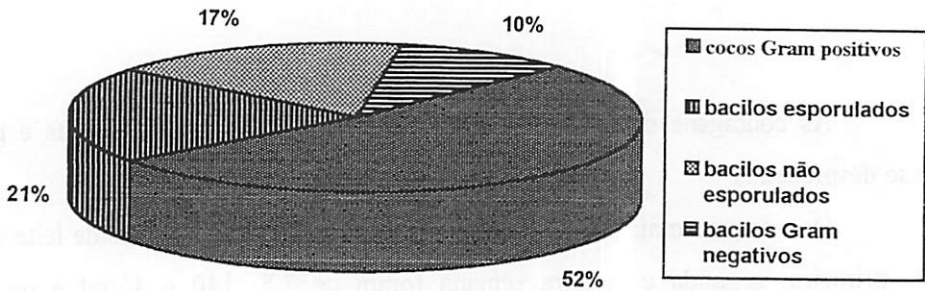


Figura 1 Grupos de microrganismos identificados no leite cru

No leite pasteurizado sem inoculação, figura 2, 46% das colônias isoladas foram bacilos Gram positivos esporulados, 46% foram cocos Gram positivos e 8% de bacilos não esporulados. O bacilos esporulados presentes foram *Bacillus coagulans*, *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium* e *Bacillus stearothermophilus*. Os cocos presentes eram *Staphylococcus* sp. Não foram identificados bastonetes Gram negativos.

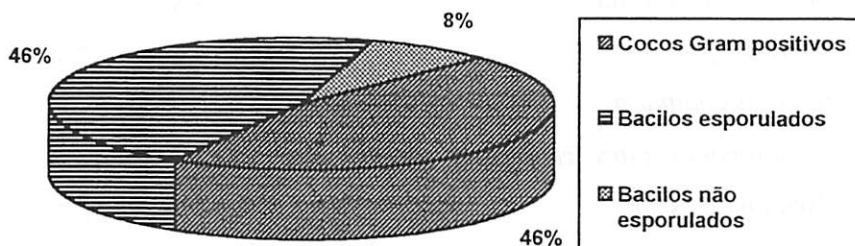


Figura 2 Grupos de microrganismos identificados no leite pasteurizado sem inoculação

Machado (1975) obteve resultado semelhante, ou seja, predomínio de cocos Gram positivos, analisando leite B cru; e no leite pasteurizado a presença de formas esporuladas resistentes ao calor.

Tanto no leite cru quanto no leite pasteurizado, não foram isoladas bactérias lácticas; isto não significa que estas bactérias não estavam presentes ou que foram eliminadas durante a pasteurização, mas que talvez estivessem em números tão pequenos a ponto de não serem detectadas e deve-se considerar também que estas bactérias possuem exigências nutricionais maiores, sendo necessário o uso de meios específicos para seu isolamento.

A tabela 3 mostra os microrganismos identificados nos leites pasteurizados inoculados com *Pseudomonas fluorescens*.

TABELA 3 Valores em porcentagem dos microrganismos identificados nos leites pasteurizados resfriados inoculados com *Pseudomonas fluorescens* de acordo com os dias de amostragem

Microrganismos Isolados	Dias de amostragem			
	0	01	03	05
<i>Bacillus megaterium</i>	66,7	63,8	58,7	44,8
<i>Bacillus sp.</i>	9,1	10,6	17,4	13,2
<i>Bacillus coagulans</i>	3,0	4,3	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6,1	12,8	0	18,4
<i>Pseudomonas sp.</i>	9,1	2,1	21,7	18,4
Bacilos gram positivos não-esporulados	3,0	4,3	2,2	0
<i>Staphylococcus sp</i>	0	2,1	0	2,6
<i>Enterococcus</i>	3,0	0	0	2,6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3,0	0	0	0

Na microbiota do leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens* houve o predomínio de bacilos esporulados (73,2%), sendo a espécie dominante deste grupo o *Bacillus megaterium* (58,5% das colônias isoladas do leite inoculado). O segundo grupo mais isolado foi o das *Pseudomonas spp.* (22%).

Dados presentes na literatura fornecem base para explicar o fato de mesmo tendo sido inoculadas, as *Pseudomonas* não terem sido o grupo de microrganismo mais isolado na microbiota do leite pasteurizado resfriado inoculado. Três são as possíveis causas: a primeira é a ocorrência da ativação da

germinação dos esporos bacterianos devido à pasteurização, já que o microrganismo mais isolado deste tipo de leite também foi isolado do leite cru em menores proporções; a segunda é a ocorrência de fases lag (fases de adaptação anteriores a fase de multiplicação das bactérias) e a terceira é um possível mecanismo de interação entre *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus megaterium*.

Com relação a um possível mecanismo de interação, através deste trabalho não há como afirmar se houve, ou não, algum mecanismo de interação entre estas bactérias, mas deve ser lembrado os registros de interações de *Pseudomonas* spp. com outros microrganismos, estimulando (Quinto et al., 1997; Marshall e Schmidt, 1991) ou inibindo (Freedman, Kondo e Willret, 1989; Jaspe et al., 1995; Cheng, Doyle e Luchansky, 1995) o crescimento dos microrganismos em questão nos respectivos estudos.

Em relação à ativação da germinação dos esporos é citado na literatura que as temperaturas empregadas nos tratamentos térmicos (pasteurização e tratamento UHT) usualmente empregados para a eliminação de bactérias presentes no leite, podem ter um efeito adverso para a manutenção da qualidade do leite e de produtos que possam vir a ser fabricados do mesmo. Algumas bactérias Gram positivas esporuladas podem ter a germinação de seus esporos ativada durante o tratamento térmico e a partir daí os esporos germinarão e começarão a dividir-se; isto porque passaram para a forma vegetativa devido ao estímulo da temperatura. Pode ser devido a isso o alto número de *Bacillus megaterium* isolado do leite pasteurizado resfriado inoculado, já que esta bactéria estava presente no leite cru em menores porcentagens. Ahmed, Moustafa e Marth (1983) declararam que a temperatura sub-letal de pasteurização pode ativar a germinação de esporos de *Bacillus cereus*. Brown et al., citados por Schroeder e Bland (1984), e Schroeder e Bland (1984) também afirmaram que a pasteurização pode levar à ativação da germinação de esporos bacterianos, com a

conseqüente perda da qualidade do produto pasteurizado. A germinação de esporos bacterianos parece ser maior no leite pasteurizado do que no leite UHT e no leite cru e Davies (1977) atribuiu este fato à formação de um germinante durante a pasteurização que permite os esporos germinarem no leite pasteurizado. Maior germinação de esporos de *Bacillus cereus* no leite pasteurizado, seguido do leite UHT e do leite cru foi obtida por Te Giffel et al. (1995a) e estes concluíram que o germinante formado estaria ainda, parcialmente, ativo no leite UHT, já a germinação neste tipo de leite foi maior do que no leite cru. No entanto, a germinação de esporos pode ocorrer até mesmo durante a preparação de amostras para análise, o que diminuirá a contagem de bactérias esporuladas como esporos, caso este seja o objetivo da análise. Te Giffel et al. (1995a) alertam que, além da demora entre a preparação das diluições das amostras a serem analisadas e a distribuição destas nos meios a serem utilizados para as contagens, o tipo e a temperatura do diluente também podem contribuir para a germinação de esporos.

O fato das *Pseudomonas fluorescens*, mesmo sendo inoculadas, não terem sido o grupo de microrganismo mais isolado do leite pasteurizado resfriado inoculado pode estar ligado a uma fase lag apresentada pelos microrganismos inoculados. As bactérias inoculadas no leite pasteurizado resfriado estavam sendo cultivadas no laboratório a 30° C e devido a esta diferença de temperatura podem ter passado por uma fase de adaptação (fase lag) antes de iniciarem divisão. Segundo Cousin (1982), a fase lag pode ser explicada pelo fato de que 7° C é menor do que a temperatura ótima de crescimento de bactérias que passam por fases lag. Stead (1987) notou pequeno ou nenhum crescimento no leite após inóculo de 10<sup>4</sup> UFC/ml de cepas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi* em leite pasteurizado integral após um dia de inoculação. Kohlmann et al. (1991) detectaram uma fase lag inicial após a inoculação de culturas de *Pseudomonas* durante quatro dias. Gomes (1988) verificou fase lag em alguns de

seus experimentos durante os quatro primeiros dias de armazenagem a 10°C. As contagens para *Pseudomonas* sp. alcançaram valores médios de 10<sup>6</sup> UFC/ml a partir do quarto dia de armazenagem em apenas 4 experimentos, nos 5 experimentos restantes este valor foi alcançado ou superado no sexto dia de armazenagem a 10°C. Van Der Zant e Moore (1955) encontraram uma curta fase lag de 24 horas ao inocularem *Pseudomonas fragi* e *Ps. fluorescens* em leite desnatado esterilizado. Estes autores afirmam que o crescimento de culturas puras inoculadas em leite estéril desnatado podem diferir do crescimento de bactérias quando crescem em populações mistas. Os mesmos autores citam que Burgwald e Josephson, Chaffee e Dahlberg detectaram fases lag de 3 a 5 dias em leite pasteurizado refrigerado com flora mista.

O isolamento de *Ps. fluorescens* no dia três de amostragem apresentou zero (0) de isolamento, isto pode ser devido às amostras coletadas conterem tão pouca quantidade deste microrganismo que levou o mesmo a não ser detectado neste dia de amostragem nas três repetições do experimento.

A porcentagem de bacilos Gram positivos não esporulados foi baixa. Neste grupo encontram-se microrganismos considerados termoresistentes, como *Microbacterium* e *Corynebacterium* (Hull et al., 1992; Cromie, 1992).

A porcentagem de enterobactérias e de cocos Gram positivos foi bastante baixa e a presença destes microrganismos indicam contaminação pós-pasteurização.

#### **4.3 Avaliação dos meios de cultura utilizados e das diferentes temperaturas empregadas**

Houve um menor crescimento de microrganismos no ágar *Pseudomonas* P do que no ágar padrão (PCA), figura 3. Porém, ao identificar os microrganismos

isolados, detectou-se que não houve um crescimento seletivo do microrganismo para o qual o meio Pseudomonas P é destinado, ou seja, não foram isolados apenas bastonetes Gram negativos.

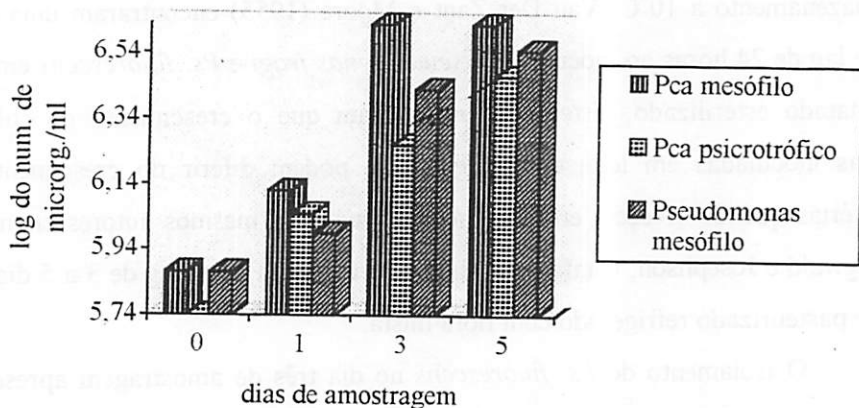


FIGURA 3 Médias das contagens de microrganismos nos respectivos dias de amostragem e meios utilizados

Devido ao fato de ter sido isolado no ágar Pseudomonas os mesmos microrganismos isolados no ágar padrão leva-nos à conclusão de que este meio não é adequado para enumeração e/ou identificação de bactéria Gram negativas a 30°C. Jay e Bue (1987) obtiveram também um resultado de ineficácia quanto a microrganismos isolados utilizando o ágar cristal violeta-tetrazolium, também indicado para o isolamento de Gram negativos.

O isolamento do mesmo tipo de microrganismo tanto na temperatura mesófila quanto na psicotrófica pode indicar que bacilos psicotróficos formadores de esporos podem ser variantes de bacilos mesofílicos que se adaptaram a temperaturas mais baixas de crescimento. Grosskopf e Harper (1974) obtiveram resultados semelhantes e chegaram a esta conclusão, da

adaptação de crescimento a temperaturas mais baixas pelos bacilos esporulados mesofílicos, após trabalharem com isolamento e identificação de psicrotróficos formadores de esporos no leite e Collins (1981) declarou que psicrotróficos termoresistentes são variantes de bacilos mesofílicos que se adaptaram ao crescimento a baixas temperaturas.

#### **4.4 Atividades lipolíticas e proteolíticas dos principais grupos de microrganismos isolados do leite pasteurizado refrigerado**

Foram analisadas as capacidades proteolíticas e lipolíticas dos bacilos esporulados e de *Pseudomonas* spp. isolados, principais grupos envolvidos na alteração da qualidade do leite e produtos lácteos devido à proteólise e lipólise. Varnam e Evans (1991) declararam que os problemas do leite UHT são devido a enzimas proteolíticas termoestáveis derivadas de bactérias psicrotróficas que cresceram no leite cru e Schraft et al. (1996) também relataram a alteração de leite e produtos lácteos devido a bacilos esporulados produtores de enzimas termoresistentes (lipases e proteases).

Das cepas de bacilos Gram positivos esporulados isoladas e identificadas, 74% apresentaram atividades proteolíticas e lipolíticas conjugadas; 12% apresentaram apenas atividade lipolítica; 8% não apresentaram qualquer tipo de atividade e 6% apresentaram apenas atividade proteolítica.

A figura 4 mostra as porcentagens de atividades lipolíticas e proteolíticas exibidas pelas cepas de *Bacillus* spp. isoladas :



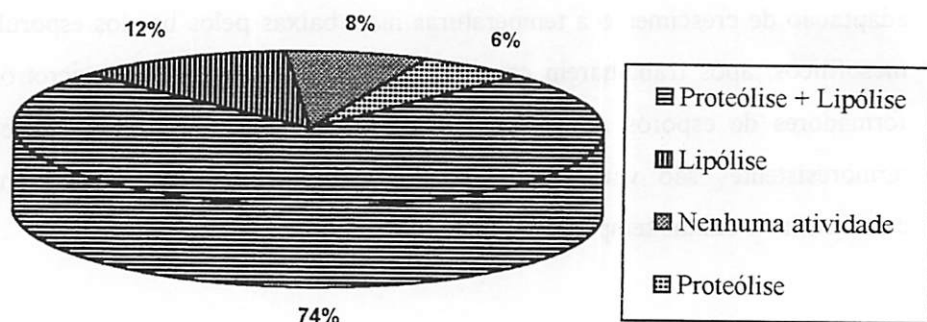


FIGURA 4 Porcentagens de atividades lipolíticas e proteolíticas exibidas pelas cepas de *Bacillus* spp. isoladas

De acordo com os dados, verificou-se que 92 % das cepas de bacilos esporulados apresentaram ambas ou uma das atividades enzimáticas. Atividades lipolíticas e proteolíticas apresentadas por bacilos Gram positivos esporulados também foram detectadas por Silveira (1997) e perda da qualidade de leite e derivados devido a enzimas destas bactérias foram relatadas por Schraft et al. (1996), Washam, Olson e Vedamuthu (1977) e Grosskopf e Harper (1969).

Das cepas de *Pseudomonas* spp. identificadas, 84% mostraram atividade conjunta de lipólise e proteólise; 8% apresentaram apenas atividade proteolítica; 5% apresentaram apenas atividade lipolítica e 3% não apresentaram nenhuma das atividades.

A figura 5 mostra as porcentagens de atividades lipolíticas e proteolíticas apresentadas pelas cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas.

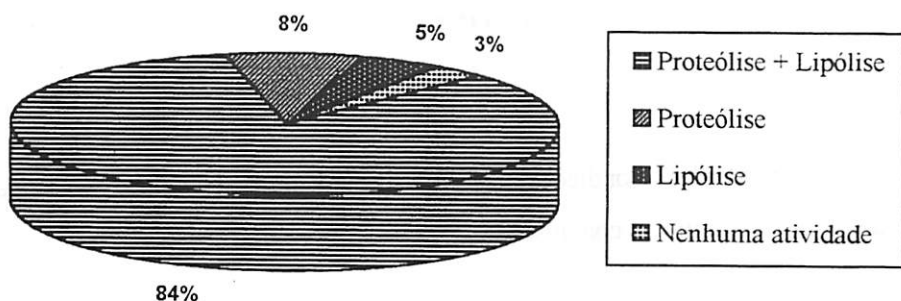


FIGURA 5 Porcentagens de atividades lipolíticas e proteolíticas exibidas pelas cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas

De acordo com os dados, 97% das cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas apresentaram atividades enzimáticas que comprometem a qualidade do leite e derivados. Cepas de *Pseudomonas* isoladas por Mckellar (1981) e Anderson et al. (1981) apresentaram atividade lipolítica e as enzimas alteraram o sabor do leite UHT e cepas de *Pseudomonas* isoladas por White e Marshall (1973) alteraram o sabor do queijo cheddar e do cottage. Jaspe et al. (1995) isolaram cepas de *Pseudomonas* proteolíticas e lipolíticas e afirmaram que o ambiente do leite (baixa concentração de ferro, aeração, etc.) e, não apenas a baixa temperatura, intervém na seleção destas cepas de *Pseudomonas*.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram o risco de alteração em potencial que representa a presença de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. no leite pasteurizado devido à produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas por estas bactérias.

## 5 CONCLUSÕES

Dentro das condições utilizadas para este trabalho, foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

- 1 - A microbiota do leite cru e do leite pasteurizado constituiu-se basicamente de bactérias Gram positivas.
- 2 - Houve um crescimento muito pequeno no número de microrganismos durante os cinco dias de armazenagem do leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens*.
- 4 - Mesmo tendo sido inoculado *Pseudomonas fluorescens* no leite pasteurizado uma concentração de  $\pm 10^6$  UFC/ml, o maior grupo isolado do leite refrigerado inoculado foi de bacilos Gram positivos esporulados, sendo *Bacillus megaterium* a espécie mais isolada.
- 5 - Os dois principais grupos de microrganismos isolados do leite refrigerado (*Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp.) apresentaram altos índices de atividades proteolíticas e lipolíticas associadas, além de apresentarem estas atividades isoladas também.
- 6 - O meio seletivo utilizado (Ágar *Pseudomonas* P) não demonstrou a referida seletividade ao isolar bactérias Gram negativas e Gram positivas na temperatura de 30°C e na de 7°C.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.M.; BRAWLEY, T.G. Heat resistant bacterial lipases and ultra-high temperature sterilization of dairy products. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n.10, p.1951-1957, Oct. 1981.
- AHMED, A.A-H; MOUSTAFA, M.K.; MARTH, E.M. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.46, n.2, p.126-128, Feb. 1983.
- ALICHANIDIS, E.; WRATHALL, J.H.M.; ANDREWS, A.T. Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.53, n.2, p.259-269, May 1986.
- ANDERSON, R.E.; HEDLUNG, C.B.; JONSSON, V. Thermal inactivation of heat-resistant lipase produced by psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.62, n.3, p.361-367, Mar. 1979.
- ANDERSON, R.E.; DANIELSSON, G.; HEDLUND, C.B.; SVENSSON, S.G. Effect of a heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high-temperature sterilized milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.3, p.375-379, Mar. 1981.
- ASLAM, M.; HURLEY, W.L. Proteases in milk. URL: Illinois Dairy Report Homepage. Site: <http://www.aces.uiu.edu/~anysistem/dairyrep/96/Aslam.html>. Consultado: 12/05/98.
- BARACH, J.T.; ADAMS, D.M.; SPECK, M.L. Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at UHT. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.31, p.875-879, 1976.
- BIRKELAND, S.-R.; STEPANIAK, L.; SORHAUG, T. Quantitative studies of heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* P1 by the enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, n.2, p.382-387, Feb. 1985.
- BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. Assessment of dairy product quality and potential shelf-life - a review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.49, n.9, p. 739-753, Sept. 1986.

- BLAKE, M.R.; WEIMER, B.C. Immunomagnetic detection of *Bacillus stearothermophilus* spores in food and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.5, p.1643-1646, May 1997.
- BOYD, J.C.; SMITH, C.K.; TROUT, G.M. The role of psychrophilic bacteria in the keeping quality of commercially pasteurized and homogenized milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.36, n.5, p.571, May 1953.
- CHENG, C-M; DOYLE, M.P.; LUCHANSKY, J.B. Identification of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from raw pork and chicken that produce siderophores antagonistic towards foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.58, n.12, p.1340-1344, Dec. 1995.
- COLLINS, E.B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.1, p.157-160, Jan. 1981.
- COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products : a review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.45, n.2, p.172-207, Feb. 1982.
- CRIELLY, E.M.; LOGAN, N.A.; ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, Great Britain, v.77, n.3, p.256-263, Sept. 1994.
- CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.47, n.2, p.96-100, Feb. 1992.
- DALALY, B.K.; ABBO, A. In 21st International Dairy Congress, v.1, n.2, p.487-488. Moscow. 1982.
- DAVIES, F.L. The role of various milk fractions and the importance of somatic cells in the formation of germinant(s) for *Bacillus cereus* when milk is pasteurized. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.44, n.3, p.555-568, Jun. 1977.
- FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.53, n.1, p.139-177, Feb. 1986.

- FARRAG, S.A.; MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* at 7 or 13°C in skim milk. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.52, n.12, p.852-855, Dec. 1989.
- FREEDMAN, D.J.; KONDO, J.K.; WILLRETT, D.L. Antagonism of foodborne bacteria by *Pseudomonas* spp. : a possible role of iron. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.52, n.7, p.484-489, Jul. 1989.
- GOBETTI, M.; ROSSI, J. Peptidases profiles of *Pseudomonas fluorescens* identification and properties. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.75, n.4, p.924-934, Apr. 1992.
- GOMES, M.I.F.V. Alterações na Qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. Piracicaba: USP. 72p. 1988. (Dissertação - Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- GROSSKOPF, J.C.; HARPER, W.J. Role of psychrophilic sporeformers in long life milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.52, n.6, p.897, May 1969.
- GROSSKOPF, J.C.; HARPER, W.J. Isolation and identification of psychrotrophic sporeformers in milk. **Milchwissenschaft**, v.29, n.8, p.467-470, Aug. 1974.
- HENDRICKS, M.T.; HOTCHKISS, J.L. Effect of carbon dioxide on the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria monocytogenes* in aerobic atmospheres. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.60, n.12, p.1548-1552, Dec. 1997.
- HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.60, n.9, p.1034-1037, Oct. 1997.
- HULL, R.; TOYNE, S.; HAYNES, I.; LEHMANN, F.L. Thermotolerant bacteria: a re-emerging problem in cheesemaking. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.47, n.2, p.91-94, Feb. 1992.
- JASPE, A. et al. Proteinase Activity of *Pseudomonas fluorescens* grow in cold milk supplemented with nitrogen and carbon sources. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.77, n.4, p.923-929, Apr. 1994.

- JASPE, A.; OVIEDO, P.; FERNANDEZ, L.; PALACIOS, P.; SANJOSE, C. Cooling raw milk: change in the spoilage potential contaminating *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.58, n.8, p.915-921, Aug. 1995.
- JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza: Ed.Acribia, 1992. 804p.
- JAY, J.M.; BUE, M.E. Ineffectiveness of crystal violet tetrazolium agar for determining psychrotrophic gram-negative bacteria. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.50, n.2, p.147-149, Feb. 1987.
- KING, A.D.; NAGEL, C.W. Growth inhibition of *Pseudomonas* by carbon dioxide. **Journal of Food Science**, Chicago, v.32, n.5, p.575-579, Sept./Oct.1967.
- KOHLMANN, K.L; NIELSEN, L.R.; STEENSON, L.R.; LADISH, M.R. Production of Proteases by Psychrotrophic Microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 74, n.10, p. 3275-3283, Oct. 1991.
- KORNACKI, J.L.; MARTH, E.H. Heat-inactivation of *Streptococcus faecium* var. *casseliflavus* in skim milk cultures with *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.49, n.7, p.541-543, Jul. 1986.
- KUMURA, H.; MIKAWA, K.; SAITO, Z. Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* n 33. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.60, n.2, p. 229-237, May 1993a.
- KUMURA, H.; MIKAWA, K.; SAITO, Z. Influence of milk proteins on the thermostability of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* 33. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.76, n.8, p.2164-2167, Aug. 1993b.
- LAW, B.A.; ANDREWS, A.T.; SHARPE, M. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.44, n.1, p.145-148, Feb. 1977.
- LAW, B.A.; SHARPE, M.E.; CHAPMAN, H.R. The effect of lipolytic gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.43, n.3, p.459-468, Oct. 1976.

- LIMA, M.C. Efeitos de tratamentos térmicos do leite tipo C em grupos de microrganismos e em seu desenvolvimento durante a estocagem a diferentes temperaturas. Viçosa:UFV,1988. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- LOSNEHAHL, K.J.; WANG, H.; ASLAM, M.; ZOU, S.; HURLEY, W.L. Antimicrobial factors in milk. URL: Illinois Dairy Report Homepage. Site: <http://www.aces.uiu.edu/~anysistem/dayryrep/96/Losnedahl.html>. Consultado: 12/05/98.
- LYON, W.J.; SETHI, J.K.; GLATZ, B.A. Inhibition of psychrotrophic organisms by propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.76, n.6, p.1506-1513, Jun. 1993.
- MacFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 2ª ed. Williams & Wilkins. Londres. 1980.
- MACHADO, E.S.V. Flora dominante do leite cru e pasteurizado. Campinas: UNICAMP. 39p. 1975. (Tese de mestrado em Ciência de Alimentos).
- MACHADO, G.C. Estratégias para implantação de um sistema de Qualidade Total em uma Indústria de Laticínios. Viçosa:UFV, 1995. 148p. (Dissertação - Mestrado na Área de Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- MARIN, A.; MAWHINNEY, T.P.; MARSHALL, R.T. Glycosidic activities of *Pseudomonas fluorescens* on fat-extracted skim milk, buttermilk and milk fat globule membranes. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.67, n.1, p.52-59, Jan. 1984.
- MARSHALL, D.L.; SCHMIDT, R.H. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected pseudomonads. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.51, n.4, p.277-282, Apr. 1988.
- MARSHALL, D.L.; SCHMIDT, R.H. Physiological evaluation of stimulated growth of *Listeria monocytogenes* by *Pseudomonas* species in milk. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadian, v.37, n.8, p.594-599. Aug. 1991.
- MARSHALL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 416p.



- McKAY, D.B.; DIECKELMANN, M.; BEACHAM, I.R. Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: the roles of lipase and esterase studied using recombinant strains over-producing, or specifically deficient in these enzymes. **Journal of Applied Bacteriology**, Great Britain, v.78, n.3, p. 216-223, Mar. 1995.
- McKELLAR, R.C. Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.11, p.2138-2145, Nov. 1981.
- McKELLAR, R.C. Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Bacteriology**, Great Britain, v.53, n.3, p.305-316, Dec. 1982.
- McKINNON, C.H.; PETTIPHER, G.L. A survey of sources of heat-resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.50, n.2, p.163-173, May 1983.
- MISTRY, V.V.; KOSISOWSKI, F.V. Influence of potassium sorbate and hydrogen peroxyde. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.68, n.3, p.605-608, Mar. 1985.
- MOHAMED, F.O.; BASSETTE, R. Quality and yield of cottage cheese influenced by psychrotrophic microorganisms in milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.62, n.2, p.222-226, Feb. 1979.
- NASHIF, S.A.; NELSON, F.E. The lipase of *Pseudomonas fragi*. I. Characterisation of the enzyme. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.36, n.5, p. 459-470, May 1953.
- OVERCAST, W.W. Psychrophilic Microorganisms and Keeping Quality of Milk and its Products. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.51, n.8, p. 1336-1338, Aug.1968.
- PATEL, T.R.; BARTLETT, F.M.; HAMID, J. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.46, n.2, p.90-94, Feb. 1983.

- QUINTO, E.J.; FRANCO, C.M.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of *Pseudomonas fluorescens* in skimmed milk at 7 or 25°C. **Journal of Food Safety**, New Brunswick, v.16, p.273-285, 1997.
- RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática: roteiro e manual-bactérias e fungos**. São Paulo:Atheneu, 1993. 112p.
- ROBERTS, R.F.; TORREY, G.S. Inhibition of psychrotrophic bacteria growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.71, p.52-60. 1988.
- ROBINSON, R.K. **Microbiologia Lactologica: Microbiologia de la leche**. Zaragoza: Ed. Acirbia, 1987 , v.1. p.1-230.
- RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J.C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; LLANO, D.G. de; REYES-GAVILAN, C. de los. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.59, n.5, p.502-508, May 1996.
- SCHRAFT, H.; STEELE, M.; McNAB, B.; ODUMERU, JOSEPH; GRIFFITHS, M. W. Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.11, p.4229-4232, Nov. 1996.
- SCHRODER, M.J.A. Origins and levels of post pasteurization contamination of milk in the dairy and their effects on keeping quality. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.51, n.1, p.59-67, Feb. 1984.
- SCHRODER, M.J.A.; BLAND, M.A. Effect of pasteurization temperature on the keeping quality of whole milk. **Journal of Dairy Research**, Grain Britain, v.51, n.4, p.569-578, Nov. 1984.
- SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. **Journal of Applied Bacteriology**, Great Britain, v.62, n.3, p.197-207, March 1987.

- SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. Growth of lipolytic psychrotrophic pseudomonads in raw and ultra-heat-treated milk. **Journal of Applied Bacteriology**, Great Britain, v.61, n.5, p.395-400, Nov. 1986.
- SIERRA, I.; PRODANOV, M.; CALVO, M.; OLANO, A.; VIDAL-VALVERDE, C. Vitamin stability and growth of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk acidified with carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.59, n.12, p.1305-1310, Dec. 1996.
- SILVA, M.H. Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite. Viçosa: UFV, 1991. 83p. (Dissertação- Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Ed. Loyola, 1997. 295p.
- SILVEIRA, I.A. da. **Estudo microbiológico do leite tipo b cru conservado sob refrigeração**. Lavras: UFLA, 1997. 84p. (Dissertação- Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- SIQUEIRA, R.S.de. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1995. 159p.
- SNEATH, P.H.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. 1599 p.
- STEAD, D. Microbial lipases : their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v. 53, n.3, p.481-505, Aug. 1986.
- STEAD, D. Production of extracelular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.54, n.4, p.535-543, Nov. 1987.
- STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.4, p.951-956, Jul./Aug. 1985a.
- STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and its attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.4, p.957-960, Jul./Aug. 1985b.

- TE GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; HOEKSTRA, J.; ROMBOUTS, F.M. Germination of bacterial spores during sample preparation. **Food Microbiology**, v.12, n.4, p.327-332, Apr. 1995a.
- TE GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; SLAGHUIS, B.A.; ROMBOUTS, F.M. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.49, n.2/3, p.125-138, 1995b.
- TERSNSTROM, A.; LINDBERG, A.M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.75, n.1, p. 25-34, Jul. 1993.
- UPLACKSH, V.K.; MATHUR, D.K.; MALIK, R.K. Thermal resistance of partially purified proteinase of *Pseudomonas fluorescens* P-26. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.76, n.4, p.356-360, Apr. 1994.
- VAN DER ZANT, W.C.; MOORE, A.V. The influence of certain factors on the bacterial counts and proteolytic activities of several psychrophilic organisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.38, n.7, p.743-750, Jul. 1955.
- VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne Pathogens: An illustrated Text**. London: Ed. Mosby Year Book:, 1991. 551 p.
- WASHAM, C.J.; OLSON, H.C.; VEDAMUTHU, E.R. Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.40, n.2, p.101-108, Feb. 1977.
- WHITE, C.H.; MARSHALL, R.T. Reduction of shelf-life of dairy products by a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* P26. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.56, n.7, p.849-853, Jul. 1973.

