**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE O TESTE DE REDUTASE E
CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS TOTAIS E
COLIFORMES TOTAIS POR METODOLOGIA CONVENCIONAL E
PELO SISTEMA PETRIFILM EM LEITE CRU REFRIGERADO**

CLEOMAR MARIA DE CARVALHO

Bióloga

Orientador: Prof. Dra. **MARÍLIA OETTERER**

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título do Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro- 2001

ERRATA

Cleomar Maria de Carvalho. Avaliação comparativa entre o teste de redutase e contagem de microrganismos totais e coliformes totais por metodologia convencional e pelo sistema petrifilm em leite cru refrigerado.

p.	item	linha	onde se lê	leia-se
xiv	summary	cinco	...fownd...	...found...
xiv	summary	onze	...dary plants.	...dairy plants.
7	2.2	três	Esta portaria...	Esta Portaria...
7	2.2	vinete cinco	...(ICMSF, 1980).	...(ICMSF, 1980).
8	2.2	sete	...(ICMSF, 1980).	...7(ICMSF, 1993).
11	2.3	catorze	...(ICMSF, 1980)...	...(ICMSF, 1993)...
11	2.3	vinete e um	...Craven & Macauley, 1993; ICMSF, 1980).	...Craven & Macauley, 1993; ICMSF, 1993).
12	2.3	dez	...(ICMSF, 1980).	...(ICMSF, 1993).
12	2.3	onze	A bactérias ...	As bactérias...
12	2.3	onze	...armazenados à baixa...	...armazenados a baixa...
33	3.1	cinco	...obtido no departamento...	...obtido no Departamento...
34	3.1.3	três	... 35 ⁰ C e 37 ⁰ C+- 1,0	... 35 ⁰ C 37 ⁰ ±C 1,0
36	3.4	quinze	...como recomenda o ?????.	...como recomenda o SAS(1996).
41	4	quinze	...mostrada na....	...mostrada nas...

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Carvalho, Cleomar Maria de

Avaliação comparativa entre o teste de redutase e contagem de microrganismos aeróbios totais e coliformes totais por metodologia convencional e pelo sistema petrifilm em leite cru refrigerado / Cleomar Maria de Carvalho. -- Piracicaba, 2001.

80 p.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Alimentos (Microbiologia) 2. Alimentos (Padrões, legislação, fiscalização) 3. Bactéria aeróbia 4. Bactéria coliforme 5. Leite e laticínio (Tecnologia) 6. Microrganismo patogênico 7. Pasteurização 8. Redutase do leite 9. Saúde animal I. Título

CDD 637.1277

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai do universo, a quem tudo devo

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, especialmente ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela oportunidade da realização do curso

Aos Prof. Marília Oetterer e Antonio Joaquim de Oliveira, pela amizade, estímulo e orientação

Ao Prof. Jorge Horii, pela concessão do material para pesquisa

Ao Prof. Flávio Augusto Portela dos Santos, pelo fornecimento do leite “in natura”

Ao Prof. Cláudio Rosa Gallo, pela amizade, incentivo e sugestões na execução deste trabalho

Aos amigos Janaina Pereira e Cristiano Nunes Nesi, pela amizade e execução da análise estatística

Aos funcionários do Departamento de Produção Animal, Francisco Benvidio Viana Andrade e Samuel Prudenciano, pela amizade e auxílio na coleta do leite

À Leila M. Spadotti, pela enorme amizade, incentivo e valiosa colaboração durante a execução deste trabalho

Ao Geraldo da Fonseca, pelo carinho, amizade e sugestões na fase inicial deste trabalho

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia, pelas correções das referências bibliográfica; Beatriz H. Giongo e Midiam Gustinelli, pela amizade e auxílio na parte de consulta das referências bibliográficas

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho

Aos meus pais

Luiz G. de Carvalho (in memoriam)

Maria Edwirges de Carvalho,

responsáveis por minhas conquistas

Dedico

À minha filha Yaiza, pela compreensão

meu irmão Luiz Antonio,

Ofereço

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Produção de leite no Brasil.....	4
2.1 Condições higiênicas do leite.....	4
2.2 Microbiota inicial do leite.....	6
2.3 Microrganismos contaminantes do leite.....	10
2.4 Microrganismos indicadores de contaminação fecal.....	12
2.5 Emprego de baixas temperaturas.....	15
2.6 Contagem de microrganismos em placas.....	19
2.7 Teste redutase.....	22
2.7.1 Redução do azul de metileno.....	25
2.7.2 Aplicação do teste de redutase.....	26
2.8 Novos métodos para contagem de microrganismos.....	28

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material.....	33
3.1.1 Matéria-prima.....	33
3.1.2 Meios de cultivo, placas, corante e vidraria.....	33
3.1.3 Equipamentos.....	34
3.2 Obtenção e preparo das amostras.....	34
3.3. Métodos.....	35
3.3.1 Análises microbiológicas.....	35
3.3.2 Teste de redutase.....	35
3.3.3 Contagem total de mesófilos aeróbios pelo sistema Petrifilm.....	35
3.3.4 Contagem de coliformes totais pelo sistema Petrifilm.....	35
3.3.5 Plaqueamento em profundidade.....	36
3.3.5.1 Contagem de microrganismos totais em PCA.....	36
3.3.5.2 Contagem de coliformes totais em VRBA.....	36
3.4 Análise Estatística.....	36
3.4.1 Diagrama de dispersão.....	37
3.4.2 Coeficiente de Correlação Linear(r).....	37
3.4.4 Teste de significância para $p(r=p)$	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE.....	66

Lista de Figuras

Página

1 Diagrama de dispersão de redutase e microrganismos totais em PCA.....	40
2 Diagrama de dispersão de redutase e log de microrganismos totais em PCA.....	40
3 Diagrama de dispersão de redutase e microrganismos totais em Petrifilm.....	42
4 Diagrama de dispersão de redutase e log de microrganismos totais em Petrifilm.....	42
5 Diagrama de dispersão de redutase e coliformes totais em VRBA.....	43
6 Diagrama de dispersão redutase e log de coliformes totais VRBA.....	44
7 Diagrama de dispersão de redutase e coliformes totais em Petrifilm.....	44
8 Diagrama de dispersão de redutase e log de coliformes totais em Petrifilm.....	45
9 Diagrama de dispersão de microrganismos totais em Petrifilm e microrganismos totais em PCA.....	46
10 Diagrama de dispersão de log de microrganismos totais em Petrifilm e log de microrganismos totais em PCA.....	46
11 Diagrama de dispersão de coliformes totais em Petrifilm e coliformes totais em VRBA.....	47
12 Diagrama de dispersão de log de coliformes totais em Petrifilm e log de coliformes totais em VRBA.....	48

AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE O TESTE DE REDUTASE E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS TOTAIS E COLIFOREMES TOTAIS POR METODOLOGIA CONVENCIONAL E PELO SISTEMA PETRIFILM EM LEITE CRU REFRIGERADO

Autora: CLEOMAR MARIA DE CARVALHO

Orientador: MARÍLIA OETERER

RESUMO

Foi investigado a correlação entre a contagem total de microrganismos aeróbios por plaqueamento em PCA e o sistema Petrifilm; correlação entre o teste de redutase e a contagem total pelas duas metodologias. Investigou-se também a relação entre o teste de redutase e a contagem de coliformes totais por plaqueamento em VRBA e sistema Petrifilm, em meio seletivo para estes microrganismos.

A análise estatística dos resultados, mostrou uma forte correlação entre contagem total de microrganismo por PCA e o sistema Petrifilm e, também entre o teste de redutase e a contagem total de microrganismo em PCA e o no sistema Petrifilm.

Para coliformes totais, a correlação entre a contagem em VRBA e no sistema Petrifilm foi significativa, mostrando uma estreita equivalência entre ambas as metodologias. Por outro lado, as correlações entre os teste de redutase e a contagem de coliformes totais por VRBA e pelo sistema Petrifilm foi menos significativa.

Levando em consideração as correlações encontradas entre estas metodologias, para a contagem total de microrganismos aeróbios, contagem de coliformes totais e o teste de redutase e, que o sistema Petrifilm é um procedimento rápido e fácil, reduzindo mão de obra, pode-se assegurar que este sistema pode substituir os métodos convencionais para o controle microbiológico nas indústrias de leite e derivados.

**COMPARATIVE EVALUATION OF REDUCTASE TEST AND
TOTAL AEROBIC MICROORGANISMS COUNTING
CONVENTIONIONAL AND TOTAL COLIFORMS COUNTING BY
METHODOLOGY AND PETRIFILM SYSTEM IN RAW
REFRIGERATED MILK**

Author: CLEOMAR MARIA DE CARVALHO

Adviser: MARÍLIA OETTERER

SUMMARY

It was investigated the correlation among the total counting of aerobic microorganisms by plating in Plate Count Agar(P.C.A.) and Petrifilm system, and also the correlation of reductase test and total counting by both methodologies. It was also investigated the relationship among reductase test and total coliforms counting in Violet Red Bile Agar(VRBA) and Petrifilm system. A total of sixty four samples were analysed.

The statistical analysis of the results showed a strong correlation among total microorganisms counting by P.C.A. and Petrifilm system, and also between reductase test and both, total microorganisms counting(P.C.A.) and Petrifilm system, demonstrating a very good equivalence among these methodologies.

For total coliforms, the correlation between VRBA counting and Petrifilm system, was significative, showing a

narrow equivalence of both methodologies. On the other hand, the correlations among reductase test and total coliforms counting by VRBA and Petrifilm system were less significative.

Talking into account the correlations fownd among these methodologies, for total aerobic microorganisms counting, total coliforms counting and reductase test, and considering that Petrifilm system is a fast procedure, saving labor, one can say that this system may be a substitute for the conventional procedures for the microbiologycal control in dary plants

1 INTRODUÇÃO

A utilização do leite como alimento é observada em todas as faixas etárias, principalmente, devido ao seu alto valor nutritivo, sua alta digestibilidade e seu indiscutível valor biológico. É considerado um alimento completo por apresentar em sua composição os principais nutrientes necessários à manutenção e desenvolvimento de um indivíduo. Entretanto, se não forem tomadas as devidas precauções na sua obtenção, transporte e armazenamento, pode-se deteriorar com muita facilidade, principalmente, por ação microbiana; ou ainda tornar-se veículo de toxinfecções para o homem.

O canal galactífero contendo bactérias, em virtude de sua comunicação com o meio externo, torna-se, dessa forma, a primeira fonte de contaminação do leite. Esses agentes, principais responsáveis pela transmissão de doenças a partir do leite e derivados, podem também ser causadores de deterioração desses alimentos.

Desta forma, para prolongar a vida útil, o leite deve ser submetido à pasteurização, tanto para o consumo em espécie, como para a elaboração de derivados. Porém, o leite pasteurizado pode ter sua qualidade afetada, e um dos principais fatores, é exatamente a qualidade do leite cru, que está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura em que o leite

permanece desde a ordenha até o processamento (Mutukumira et al., 1996). Geralmente, a qualidade do leite está associada à carga microbiana presente e diretamente relacionada às práticas de obtenção e manuseio pelo produtor. Assim, podem afetá-la, principalmente as condições de higiene na ordenha, sanidade dos animais e do ordenhador e a qualidade bacteriológica da água servida no estábulo (Hühn et al., 1980).

Leite contaminado com microrganismos, muitas vezes patogênicos, oriundos do rebanho leiteiro ou do pessoal, representa sério risco para a saúde pública, sendo assim, o aspecto sanitário assume um papel decisivo na qualidade do leite e de seus derivados. Sob este ponto de vista, (Kitchen, 1981) enfatiza que investigações bacteriológicas e físico-químicas do leite tornam-se cada vez mais importantes, no sentido de fornecer subsídios às futuras pesquisas que objetivam auxiliar a melhoria das etapas de produção, beneficiamento e comercialização do produto.

A presença de microrganismos no leite cru interfere na sua qualidade e conseqüentemente, provoca alterações indesejáveis nos produtos derivados, o que torna necessário o controle das condições higiênicas do mesmo. Este controle pode ser efetuado por meio de testes, dentre os quais se destacam o teste de redutase e a contagem de microrganismos; visto que as anormalidades ocorridas no leite cru têm interessado às cooperativas de laticínios e aos produtores de leite, uma vez que este produto corre risco de desclassificação de seus produtos. A maioria destes produtores prefere adotar o teste de redutase pela

facilidade, rapidez e baixo custo que apresenta, sem entretanto se preocupar com a precisão do teste.

Dessa forma, este trabalho tem a finalidade de avaliar e comparar o sistema Petrifilm com a metodologia padrão, contagem de microrganismos aeróbios totais e coliformes totais, e estabelecer uma possível correlação com o teste de redutase, em leite cru refrigerado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de leite no Brasil

Os cuidados necessários à obtenção higiênica do leite se iniciam com o atestado de saúde do animal, do ordenhador, das condições sanitárias do ambiente onde as vacas são ordenhadas, bem como do tratamento aplicado (Santos, 1972). No caso de leite em particular, o aspecto bacteriológico, tem através dos tempos, recebido mais atenção. Isto ocorre devido ao fato de que as bactérias nesse meio podem causar infecções e intoxicações alimentares, bem como a sua deterioração, diminuindo sua vida útil. Do ponto de vista de saúde pública, a análise bacteriológica do leite torna-se cada vez mais importante (Goldoni et al., 1977).

A ordenha, preferencialmente mecânica, deve ocorrer dentro dos mais criteriosos padrões sanitários. Mesmo em condições ótimas, o leite apresentará uma carga microbiana que deve ser mantida constante, evitando-se a multiplicação da mesma no leite (Ajzenal, 1994).

Os procedimentos higiênicos dispensados durante a obtenção e a manutenção do leite até sua entrada no estabelecimento de beneficiamento, determinarão o tipo e a quantidade desses contaminantes. A saúde do rebanho leiteiro, as boas práticas durante a ordenha, a conservação do leite em baixa temperatura até o momento do

processamento são fundamentais para evitar o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela sua deterioração. Estes cuidados são essenciais para a fabricação de bons produtos derivados, já que a qualidade destes depende da boa qualidade do leite utilizado como matéria-prima (Ponsano et al., 1999).

Hühn et al. (1980), afirmam que a qualidade e a durabilidade de um produto dependem em grande parte, da qualidade da matéria-prima utilizada na sua fabricação. É praticamente impossível melhorar as características de um produto derivado, se o número de microrganismos inicialmente presente no leite "in natura" é elevado.

Para assegurar a qualidade do leite e derivados a serem comercializados, é fundamental que seja feita uma avaliação das características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas do leite cru a ser utilizado como matéria-prima (Brasil, 1993). Na indústria laticinista são realizados vários testes classificatórios para o leite, alguns deles servindo, inclusive, como índice para o pagamento ao produtor. De modo geral, após a medição do volume do leite e da verificação de sua temperatura na plataforma, ele é submetido a uma série de determinações que incluem, entre outras, as porcentagens de gordura, extrato seco total e desengordurado, densidade, índice crioscópio, acidez titulável e tempo de redução do azul de metileno, também chamada prova de redutase (LANARA, 1981).

Estimativas mostram que, no Brasil, são comercializados 3,1 bilhões de litros por ano de leite cru "in natura". Constatou-se que, em 1993, apenas 75,5% da população brasileira teve a opção de adquirir leite

pasteurizado para consumo doméstico. Neste mesmo ano, os 24,5% restantes (cerca de 3 bilhões de habitantes), adquiriram 1,32 bilhões de leite cru (Vargas, 1995).

A produção de leite no Brasil tem aumentado, aproximadamente, 7% ao ano, tendo sido registrado, em 1996, o total de 19 bilhões de litros (Oliveira et al., 1999).

2.2 Microbiota inicial do leite

Sendo o leite um dos produtos mais importantes na alimentação humana, a higiene leiteira, ou seja, a produção de leite limpo e são, tem por objetivo a higiene humana. É inexistente uma barreira entre a higiene e a profilaxia, pois, a profilaxia é a ciência que trata dos meios de impedir a eclosão e transmissão de doenças; a higiene é a primeira medida a ser adotada ao se fazer profilaxia (Garcia et al., 2000).

A matéria-prima é um fator importante na qualidade microbiológica dos produtos derivados, pois se excessivamente contaminada, refletirá em um produto de má qualidade, revertendo em prejuízos para o produtor ou fornecedor (Hühn et al., 1980).

O Ministério da Agricultura Abastecimento e Reforma Agrária (MAARA), a Secretaria de Inspeção de Produto Animal (SIPA) e o Serviço de Inspeção Federal (SIF), considerando a importância representada pelo controle de qualidade das matérias-primas, produtos e subprodutos de laticínios, visando a preservação da saúde do consumidor, e o combate às fraudes, aprovaram

em 7/3/1983 a Portaria n.6, que dispõe sobre o "Sistema de controle da qualidade do leite e dos produtos lácteos". Esta portaria determina que o leite "in natura", imediatamente após sua chegada ao estabelecimento recebedor, deve ser controlado, bem como deve ser verificada a higiene do veículo e dos latões para transporte do leite. Deve-se também proceder às provas de alizarol, testes organolépticos, crioscopia e extrato seco, para verificação de uma eventual aguagem, além das pesquisas de presença colostro, pus, sangue, fervura, conservador e/ou inibidor, neutralizante, reconstituintes de densidade; lactofiltração e teste de redutase. Por essa mesma portaria torna-se obrigatório o teste de redutase em leite pré-beneficiado (Brasil, 1993).

Ajzenal(1994) salienta que todos os alimentos "in natura" de origem animal, incluindo carne, ovos e leite, contem um certo número de microrganismos que podem apresentar potencial patogênico. Estão incluídos, tanto causadores de intoxicações, como também de infecções entéricas ou mesmo sistêmicas.

No leite e derivados estas bactérias promovem a deterioração da qualidade destes alimentos; originando sabores estranhos e defeitos físicos em produtos lácteos (ICMSF, 1980).

Dentre as espécies bacterianas presentes, destacam-se o gênero *Micrococcus*, seguido por *Streptococcus* e *Corynebacterium*. A taxa e o tipo de microrganismo podem ser afetados em condições anormais resultantes de infecções e

enfermidades; devido a realização de ordenha sem higiene; conseqüentemente, o leite alcança valores muito altos de microrganismos, os quais podem ser facilmente observados ao microscópio, juntamente com os leucócitos polimorfonucleares. Esses leucócitos são escassos em leite normal, vindo aumentar significativamente, com a infecção (ICMSF, 1980).

Mesmo em leite, obtido assépticamente, podem estar presentes cepas pertencentes aos gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Coliformes* procedentes da terra e esterco, que podem passar com certa facilidade para o leite e seus derivados (Buchanan & Gibbons, 1974).

Em leite armazenado à baixas temperaturas, pode-se verificar o desenvolvimento de microrganismos. As principais características da microflora, que afetam a qualidade do leite refrigerado, são as atividades proteolítica e lipolítica dos psicrotóxicos, principalmente pseudomonas. Investigações sobre a microflora psicrotóxica em leite cru refrigerado, mantido em tanques de fazenda, mostraram que o gênero *Pseudomonas* é normalmente dominante, juntamente com *Achromobacter*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium* (Prata et al., 1996).

Behmer (1984) enfatiza a importância da sanidade do ordenhador que manipula o leite, a sanidade do animal e a conscientização do perigo que o leite representa, como veículo de germes patogênicos, e além disso acrescenta que, de nada valeriam as normas preconizadas para a indústria de laticínios, caso os seus responsáveis não estivessem habilitados para implantar o processo de pasteurização,

principalmente em leite que é, reconhecidamente de baixa qualidade.

As principais fontes responsáveis pelo desenvolvimento microbiano inicial podem ser equipamentos de ordenha e a limpeza deficiente, que propiciam o rápido desenvolvimento de bactérias coliformes, e bacilos Gram-positivos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e outros (Jay, 1992).

Oliveira (1976) afirma que é perfeitamente possível melhorar, substancialmente e a curto prazo, a qualidade microbiológica do leite, sem que haja a necessidade de grandes investimentos, sendo preciso apenas a melhoria das condições higiênicas da ordenha e manuseio do leite, higienização dos utensílios e equipamentos que entram em contato com o mesmo, bem como a diminuição do tempo de permanência, sem refrigeração adequada.

Iturrino-Schocken et al. (1982) estudando o efeito de várias medidas higiênico-sanitárias durante a ordenha, constataram que contagens bacterianas, relativamente baixas, podem ser conseguidas quando são adotadas medidas de higiene adequadas, como a utilização de tempo reduzido entre a coleta e a chegada do leite ao laboratório.

Os processos de pasteurização, UHT e ultrafiltração originam produtos lácteos livres de microrganismos. Estes tratamentos térmicos garantem a ausência de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Brucella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Coxiella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, desde que as tecnologias envolvidas para o processamento sejam rigorosamente cumpridas (Ajzenal, 1994).

Thomas (1974a), citado por Prata et al. (1996) estudou a influência de bactérias Gram-negativas na microflora dos equipamentos higienizados por diferentes métodos; observou que a maioria era representada por psicrotróficos presentes em maior proporção (75%), na microflora de tanques inadequadamente higienizados, enquanto uma baixa proporção(10%), é representada por bactérias termodúricas.

Machado (1975), estudando a flora dominante em leite cru e pasteurizado, encontrou que os cocos Gram-positivos representavam cerca de 70% do total de microrganismos isolados, sendo que no leite cru, somente o gênero *Streptococcus*, constituiu cerca de 50%, enquanto que no leite pasteurizado os *Micrococcus* atingiram, praticamente, a mesma proporção (47,9%).

2.3 Microrganismos contaminantes do leite

No Brasil, a má qualidade do leite está relacionada com o controle higiênico-sanitário deficiente, enquanto que nos países desenvolvidos, a má qualidade do leite é atribuída a presença de mastite bovina. Os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, sempre presentes no úbere mastítico e o grande número de células somáticas presentes no leite, reduzem acentuadamente a sua qualidade (Tavares, 1996).

Microrganismos contaminantes, provenientes de equipamentos, utensílios, meio ambiente e mesmo do pessoal responsável pela obtenção e manipulação do leite, são os

mais importantes sob o ponto de vista tecnológico, pois podem causar alterações indesejáveis ao leite, comprometendo sua qualidade e de seus derivados, podendo inclusive, se tornar impróprio para consumo (Ponsano et al., 1999).

A carga microbiana do leite cru é de extrema importância na qualidade final de produtos lácticos. Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, devido a sua contaminação, principalmente pelas bactérias psicrótróficas, formadoras ou não de esporos, que apesar de seu crescimento lento, produzem grande quantidade de enzimas (lipases e proteases), que atuam de forma similar ao coalho (ICMSF, 1980) e rapidamente alteram o produto, conferindo sabor amargo, de frutas ou pútrido, e tonalidades que vão do púrpura ao roxo. Geralmente, as mudanças no sabor ou aparência física, se devem a microrganismos que apresentam essas atividades, como coliformes, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* (Bishop & White, 1988; Craven & Macauley, 1993; ICMSF, 1980).

A importância dos microrganismos em produtos lácticos se resume a três condições:

- a) Os microrganismos são agentes responsáveis por sabores, aroma e características físicas desejáveis que aparecem durante a elaboração de queijos, leites fermentados e manteiga maturada.
- b) Os produtos lácticos podem ser contaminados por microrganismos patogênicos ou toxinas microbianas e,

portanto, servir de veículo na transmissão de enfermidades para o homem e outros animais.

c) Muitos microrganismo podem originar sabores estranhos e defeitos físicos nos produtos lácticos, o que comprova a necessidade não apenas do conhecimento da natureza e a fonte mais provável dos microrganismos implicados, mas também os fatores que afetam o seu desenvolvimento e destruição, para que medidas adequadas sejam tomadas para o seu controle (ICMSF, 1980)

A bactérias psicrotróficas em alimentos armazenados à baixa temperatura (0 a 10⁰C), promovem a deterioração durante armazenamento prolongado. Este período de armazenamento sob refrigeração, tanto de matéria-prima quanto de alimentos processados, têm aumentado a importância desses microrganismos. A matéria-prima, mantida sob refrigeração antes do processamento, assim como alimentos termo-processados não esterilizados que dependem de refrigeração para armazenamento, estão sujeitos à perda de qualidade e possível deterioração por bactérias pertencentes a este grupo de microrganismos (Neder, 1992).

2.4 Microrganismos indicadores de contaminação fecal-Coliformes

Organismos coliformes são absolutamente indesejáveis na indústria de laticínios, pois são causadores de diversos defeitos no leite e seus derivados (Machado, 1975). Podem constituir 5 a 20% da flora psicrotrófica do leite cru.

Multiplicam-se lentamente a 3-5°C, porém o crescimento é muito mais rápido a 7°C (Morse, et al., 1970).

O grupo de microrganismos coliformes é restrito ao trato gastrointestinal de humanos e animais homeotérmicos. Este grupo inclui bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, Gram-negativas, não esporogênicas, com capacidade de fermentar a lactose com produção de gás e ácido num período de 48 horas a 35°C (Speck, 1992).

Os principais microrganismos coliformes são *Escherichia coli* e *Aerobacter aerogenes*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Ambas são bastonetes curtos, Gram-negativas e fermentam a lactose com produção de gás, sendo diferenciadas por testes bioquímicos (Jawetz , 1970).

São bactérias normalmente utilizadas como indicadoras da qualidade sanitária dos alimentos porque estão em maior número no trato intestinal, em relação a outros microrganismos e crescem bem em vários substratos, tornando-se fácil o seu desenvolvimento (Frazier, 1993). Essas bactérias também estão altamente relacionadas com os patogênicos intestinais presentes nos alimentos. Assim, a presença desses microrganismos indicará as condições do tratamento térmico feito, falta de sanificação dos equipamentos e manuseio inadequado (Ashton, 1992).

Coliformes originários de mastite bovina, provocam febre após 12 horas da ingestão do alimento. O animal apresenta grande sensibilidade no quarto inchado, nesta fase; o leite se torna aquoso ou apresenta soro do sangue, com coágulo e elevada contagem de células somáticas subseqüentes (Harmon, 1984).

Além de representar um risco à saúde do consumidor, as linhagens de coliformes psicotróficas podem se multiplicar no leite mantido sob refrigeração (Nascimento, et al., 1991), produzindo toxinas termorresistentes (Oliveira et al., 1999). As fontes mais importantes de contaminação do leite são os equipamentos devido a limpeza e sanitização deficientes (Moreno et al., 1999).

Em alimentos processados, os coliformes indicam processamento inadequado ou uma contaminação pós processamento, mais provavelmente através de operários, instrumentos, equipamentos, da matéria-prima antes do processamento, que pode ter sido contaminada por contato humano, solo, esterco ou água poluída de origem fecal (Figueiredo, 1991).

Os coliformes estão muito difundidos e podem ser detectados em vários tipos de alimentos mas não indicam, necessariamente, uma contaminação de origem fecal, no sentido de envolver contato direto ou indireto com fezes. A presença destes microrganismos em leite cru é freqüentemente atribuída às práticas precárias de higiene durante a ordenha e nas etapas subseqüentes (Moreno et al., 1999).

De acordo com Oliveira & Caruso (1996), testes para organismos coliformes têm a finalidade de avaliar as condições sanitárias de produção, determinar a presença de inflamações do úbere causadas por certas espécies deste grupo e também avaliar a eficiência de pasteurização.

2.5 Emprego de baixas temperaturas

As temperaturas ambientais constituem-se em verdadeiro entrave para a obtenção de leite de boa qualidade higiênica, mormente quando não são acionados, adequadamente os processos de proteção, como, o pronto resfriamento após a ordenha, a rapidez no transporte até as usinas de beneficiamento, o adequado armazenamento anterior à pasteurização (Panetta, 1993).

Pode-se afirmar que, sem dúvida, o emprego do frio é de suma importância na conservação do leite, e também que a temperatura exerce grande influência na durabilidade do produto. Leites mantidos a temperatura de 5°C tem durabilidade maior que os conservados a 25°C, no entanto, sabe-se que temperatura de refrigeração pode propiciar o desenvolvimento de microrganismos mesófilos e psicotróficos (Prata et al., 1996). Estas bactérias são comumente encontradas no leite refrigerado (Rogick, 1981).

Almeida & Furtado (1993), observaram que microrganismos que normalmente contaminam o leite, crescem numa ampla faixa de temperatura. Essa flora inclui, além dos mesófilos, microrganismos termófilos e psicotróficos.

A má qualidade do leite resulta da ausência total de refrigeração do leite na fonte de produção. Sendo o leite um produto onde milhares de bactérias e suas enzimas encontram-se em constante atividade; a temperatura é de primordial importância para controle das diversas fermentações ocorrentes (Hasken, 1972).

A temperatura de armazenamento tem uma decisiva influência no desenvolvimento de microrganismos em leite.

Esta influência é atribuída à acidificação do leite cru, a organismos ácido-produtores, que se desenvolvem rapidamente em temperaturas superiores a 15°C. Este grupo apresenta temperatura ótima de crescimento ao redor de 30°C e evidencia pouco ou nenhum desenvolvimento em temperaturas inferiores a 10°C (Gehriger, 1991). Este pesquisador relata que nestas condições, predominamos estreptococos e organismos do grupo coliformes, ambos acidificantes.

O fundamento da aplicação de refrigeração, é afastar a temperatura do leite da temperatura ótima de crescimento dos microrganismos, para com isto reduzir a velocidade de multiplicação da flora, sem alterar as características do leite (Machado, 1975).

Nos programas sanitários para leite de consumo, um dos fatores fundamentais para melhorar a qualidade do leite é o resfriamento na própria fazenda. Na indústria de laticínios, onde grandes volumes de leite ficam armazenados à temperatura de refrigeração por longos períodos, as bactérias psicotróficas podem desenvolver-se causando mudanças indesejáveis no leite e nos seus derivados (Silveira et al., 1998). A presença desses microrganismos indica a baixa qualidade do leite e insatisfatórias condições sanitárias no processamento (Ravanis & Lewis, 1995).

Rogick (1981), reafirma que o emprego do frio é de suma importância na conservação do leite. Em épocas passadas, era utilizada uma branda refrigeração no leite cru; isso ocasionava severas modificações no "flavour" devido ao desenvolvimento de uma alta acidez no leite, pelo

crescimento de estreptococos lácticos e outras bactérias mesofílicas.

Weber (1986) constatou que a qualidade do leite conservado a baixa temperatura é condicionada por vários fatores. O mais importante é a contaminação no momento em que é resfriado. Para uma mesma temperatura, o número de bactérias totais, no final da conservação, está ligado à contaminação inicial do leite, e que esta é inferior a 500 germes psicrotróficos por mL, se esse número permanece inferior a 15.000 por mL, tornando assim a progressão mais rápida; e o leite conservado nessas condições, contém mais de um milhão de psicrotróficos por mL.

Zall et al. (1983) citam que há um especial interesse em produtos industrializados que têm como matéria-prima, o leite; devido ao crescimento de bactérias psicrotróficas em leite refrigerado e também pela necessidade de grande quantidade de leite a ser mantido a baixa temperatura, durante seu armazenamento. Esse procedimento não é eficiente para controlar e destruir os microrganismos, após sua entrada no leite. O crescimento de psicrotróficos em leite refrigerado é o maior problema de qualidade, devido ao seu desenvolvimento em produtos frescos. O problema torna-se ainda mais sério quando se considera que o uso intensivo da refrigeração, desde a fazenda até a residência do consumidor, pode provocar uma gradativa seleção para esse grupo. Tem-se observado que um grande número de espécies consideradas estritamente mesófilas, já está sendo incluído entre os psicrotróficos (Collins, 1981).

De acordo com Madiedo et al.(1998), o uso de refrigeração em fazendas e em plantas de processamento, é

indicado para conservar a qualidade do leite, através da redução do crescimento de bactérias mesofílicas, e também aumentar o tempo de armazenamento de leite cru antes de ser processado. Para os autores, a refrigeração origina um processo seletivo, favorecendo a multiplicação de bactérias psicotróficas, presentes como contaminantes normal em leite cru. A utilização de baixas temperaturas para possibilitar um maior período de armazenamento do leite pasteurizado, para consumo, e daquele utilizado na elaboração de derivados, possibilita o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos capazes de provocar alterações no leite pasteurizado e seus produtos (Prata et al., 1996). Dentre as alterações relatadas por Gomes (1988), destaca-se é a produção de lipases; embora o processo de lipólise microbiana só deverá ocorrer quando o número de microrganismos estiver em torno de 10^7 /ml de leite, com produção de lipase ácida no leite.

A importância de proteases e lipases extracelulares sintetizadas por bactérias psicotróficas, as quais crescem em leite refrigerado, está no fato de que a maioria dessas enzimas pode resistir ao tratamento UHT. (Griffiths e Phillips, 1984) afirmam que nessas condições a produção dessas enzimas deve ser minimizada. Muitos desses psicotróficos produzem enzimas termorresistentes, que devem reduzir a qualidade e vida útil de leites tratados termicamente e seus produtos elaborados a partir do leite contaminado; por essa razão, bactérias psicotróficas são significativamente importantes na deterioração de produtos industrializados.

A presença de bactérias termodúricas, que são capazes de se desenvolver lentamente em leites refrigerados, constitui em um problema para a contagem de mesófilos. Uma quantidade elevada delas contribui para o aumento da contagem total nos produtos pasteurizados (Nader Filho et al., 1983).

A prática de refrigerar leites em tanques, foi introduzida por volta de 1950, o que determinava um rápido resfriamento e armazenamento a frio do leite nas fazendas e laticínios. Esse procedimento deveria inibir as bactérias mesofílicas, causadoras de deterioração no leite e derivados, porém, a manutenção do leite à temperatura de refrigeração tem criado novos problemas devido a seleção de bactérias psicotróficas (Fairbairn & Law, 1986).

2.6 Contagem de microrganismos em placas

O controle higiênico mais usado para o leite é sem dúvida, a contagem bacteriana, pois permite conhecer a sua qualidade microbiológica, importante fato para determinar o destino da matéria-prima para consumo "in natura", ou transformação em subprodutos, após tratamento adequado (Garcia et al., 2000).

A contagem de microrganismos mesófilos, é o método mais adequado para avaliar a qualidade microbiológica global de um produto, pois fornece uma indicação das condições higiênicas. Do ponto de vista sanitário, uma contagem de mesófilos elevada, ou seja, acima de 10^5

UFC/mL, indica a presença de microrganismos (Richter et al., 1992; Bourgeois, 1990).

Tecnologicamente, uma microbiota mesófila numerosa indica um processo de deterioração de origem microbiana, sugerindo deficiência no processamento e/ou nas condições de estocagem (Bourgeois, 1990; Nascimento et al., 1991). Não existe, entretanto, uma correlação precisa entre a contagem de mesófilos e o tempo necessário para que as alterações sejam perceptíveis organolepticamente (Brazis, 1991). Do ponto de vista sanitário, uma contagem de mesófilos elevada, ou seja, acima de 10⁵ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), indica a presença de microrganismos patogênicos (Moreno et al., 1999).

O controle da qualidade microbiológica do leite cru pode ser feito por contagem em placa ou contagem direta de células simples através de microscópio ou meios eletrônicos (Bockelmann, 1977). O conhecimento do conteúdo bacteriano, assim como o tipo de bactéria presente no leite é de grande importância no controle de qualidade, uma vez que contagem elevada pode indicar refrigeração inadequada e métodos não higiênicos na produção, manuseio e processamento (Oliveira & Caruso, 1996).

Kilbourne (1920) citado por Gallo (1978), enfatiza o perigo de se usar contagem total como único meio para avaliar a qualidade de amostras de leite. Entretanto a contagem total é importante na determinação da qualidade de um alimento, já que existe perigo potencial de se encontrar microrganismos patogênicos e/ou deterioradores, quando

altas contagens microbianas são observadas em alimentos (Hobbs & Gilbert, 1974).

O método de contagem de microrganismos em placas é um método abrangente, que pode ser utilizado tanto para a contagem de aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, bolores e leveduras, clostrídios sulfito redutores como também *Staphylococcus aureus*. Os pesquisadores acrescentam ainda que este método se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra, irá formar, quando fixada em um meio de cultivo sólido adequado, uma colônia visível e isolada (Silva et al., 1997).

Contagem global em placas (CGP), determina diretamente, o número de microrganismos presentes no leite, sendo expressa em unidades formadoras de colônias/mL (UFC); em condições ideais de higiene na ordenha, a CGP inicial do leite situa-se em torno de 1000 a 9000 UFC/mL (Spreer, 1991). Este método apresenta a desvantagem de despende mais tempo (24-48hs), e ser oneroso (Oliveira & Caruso, 1996).

A metodologia de contagem de coliformes a 30°C por meio de placas, baseia-se na utilização de um meio de cultura seletivo e diferencial, Agar VRB (Violeta vermelho bile lactose), que permite distinguir as colônias fermentadoras da lactose, pela viragem do indicador de pH, o vermelho neutro, e aparecimento de um halo ao redor da colônia devido a precipitação dos sais biliares, (Hajdenwurcel, 1999).

Barros et al. (1984), analisando leite cru destinado à pasteurização, em São Paulo (capital), obtiveram resultados entre $2,0 \times 10^6$ e $6,9 \times 10^7$ ufc/mL, para contagem de

microrganismos mesófilos totais e, entre $3,6 \times 10^6$, e $1,1 \times 10^7$ ufc/mL, para os coliformes totais.

Karin e Kachani, citados por Antunes & Oliveira (1986), estudando a flora de leite cru, verificaram que a maioria das amostras analisadas mostrou contagens totais entre $5,0 \times 10^6$ e $3,0 \times 10^7$ ufc/mL e que predominavam bastonetes esporulados, micrococos e coliformes sobre a flora acidificante.

Oliveira (1976), observou que os níveis de microrganismos totais em leites pasteurizados comercializados na cidade de Campinas (SP), apresentaram contagens na faixa de 10^3 a 10^6 . Este pesquisador comenta que, leite cru apresentando contagens tão elevadas, fica fácil prever que a qualidade do produto pasteurizado oferecido ao consumidor, fica igualmente prejudicada.

2.7 Teste de redutase

Segundo Barkworth et al. (1942), até 1937, o leite na Inglaterra era classificado por meio de contagem em placas, embora os bacteriologistas já estivessem cientes dos erros e desvantagens desse método, que de certa forma impedia a caracterização do leite em uma faixa mais ampla. Dada as dificuldades da contagem por semeadura, o teste de redução de corantes foi introduzido na rotina industrial, passando a ser usado em larga escala. Em janeiro de 1937, o Ministério da Saúde da Inglaterra abandonou o uso da técnica de contagem em placas, substituindo-a pelo teste de

redutase, considerando a descoloração total no leite à temperatura estipulada.

Panetta (1993) menciona a importância da execução do teste de redutase, com a finalidade de se verificar a existência de contaminação excessiva no leite. Esta prova é caracterizada pelo tempo de descoloração do azul de metileno (indicador) a 37,5°C. Os autores ressaltam também, que o resultado deve ser associado a outras provas para se assegurar uma avaliação mais precisa.

O teste de redutase baseia-se no fato da maioria das bactérias que se desenvolvem no leite, abaixarem o potencial de oxidação-redução, provocando mudança da cor de certos corantes, estimando indiretamente o número de bactérias nas amostras de leite, as quais determinam mudanças no substrato causadas pela atividade metabólica, diminuindo a quantidade de oxigênio dissolvido e pela produção de metabólitos e enzimas específicas (Solberg et al. 1974).

A prova da redutase, técnica tradicionalmente empregada em laticínios (Germano & Germano, 1995), fornece informações relativas à carga microbiana presente no leite cru, com base na capacidade do corante empregado (azul de metileno) em mudar de cor, de acordo com o potencial de oxi-redução do meio (Nader Filho et al., 1983). Na presença de oxigênio, o corante apresenta coloração azul, passando a incolor conforme diminui a concentração desse gás no meio, em decorrência do metabolismo microbiano. Essa prova é utilizada nos laboratórios de controle de qualidade de estabelecimentos beneficiadores para classificação do

produto para consumo "in natura" e para fins industriais (Ponsano et al., 1999).

De acordo com Standard Methods for the Examination Dairy Products (A.P.H.A., 1978) o tempo de redução deve ser inversamente proporcional à população bacteriana, o que foi comprovado, comparando-se a variação do tempo de redução com as populações bacterianas, determinadas por outros métodos. A aplicação do teste, permite classificar as amostras em dois ou mais grupos, de acordo com as diferenças das espécies bacterianas, mas para colostro, leite evaporado e leite de animais em adiantado estágio de lactação, o tempo de redução não é proporcional à população bacteriana. A importância desse teste é que um número de amostras relativamente grande pode ser analisado em curto espaço de tempo e com poucos equipamentos (Oliveira & Caruso, 1996), e segundo Amaral (1985), permite um melhor controle rotineiro de trabalho.

Segundo o Standard Methods for the Examination Dairy Products (A.P.H.A., 1978), o teste pode ser influenciado por fatores como:

- diferença na atividade de redução de espécies bacterianas quando a amostra é incubada a $35 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Por exemplo, a maioria das bactérias termodúricas são menos ativamente redutoras do que muitas outras contaminantes comuns do leite, que são prontamente detectadas no teste de redutase. O mesmo ocorrendo com as bactérias psicrotróficas.
- variação na proporção de bactérias que se deslocam na camada de creme pela elevação dos glóbulos de gordura.
- presença de substâncias inibidoras, como resíduos de antibióticos, do tratamento de mastite bovina.

2.7.1 Redução do azul de metileno

Em sistemas biológicos, tais como cultivo de microrganismos, as reduções e oxidações simultâneas são fonte de energia para os processos celulares (Amaral, 1985).

Os métodos de redução de corantes é, fundamentalmente, uma medida na tendência de um sistema reversível, de liberar e captar elétrons, sendo a oxidação um processo que se comporta como perda de elétrons, e a redução como admissão de elétrons. A redução do azul de metileno depende da capacidade dos microrganismos presentes nos produtos lácteos, para produzir condições redutoras no meio em que estão proliferando; por outro lado, a inversão dos tubos exatamente no momento da redução atrasa, freqüentemente, a mudança da cor, pela introdução de oxigênio, elevando o potencial de oxi-redução (Foster, 1957). Estes pesquisadores afirmam que diferentes explicações têm sido dadas para o mecanismo de redução do azul de metileno, durante o teste. Segundo ele, o oxigênio removido do leite, através do processo respiratório das bactérias, promove a mudança no potencial de oxi-redução. Tendo o oxigênio normalmente um potencial positivo, quando este diminui, possivelmente o hidrogênio presente nos constituintes do leite e metabólitos das bactérias são transferidos para o azul de metileno, fazendo-o passar para a forma leuco (incolor).

O Standard Methods for the Examination of Dairy (A.P.H.A., 1978), determina que a leitura dos resultados poderá ser feita após trinta minutos de incubação dos

tubos, a $37^{0}+0,2^{0}\text{C}$, de hora em hora ou até a descoloração total. Neste compêndio é encontrada a seguinte observação, "embora a redução do azul de metileno ocorra em baixos valores de pH (> acidez), a habilidade de um microrganismo em produzir ácido e reduzir o corante não são necessariamente correlacionadas".

2.7.2 Aplicação do teste de redutase

O tipo e quantidade de microrganismos contidos no leite, são fatores primordiais na sua qualidade, e conseqüentemente refletem o grau de higiene praticado na ordenha (Franklin, 1965), sendo que o equipamento utilizado pode constituir-se em uma das mais importantes fontes de contaminação (Smythe, 1960).

Bermúdez, Bonilla, Del-Bagliví e Laborde (1976) preocupados com o fator higiene do leite, utilizaram entre outros métodos, o de redução do azul de metileno (TRAM). Os resultados foram positivamente confirmados, obtendo-se para o teste, os seguintes valores: 2,06% das amostras tiveram um tempo de redução superior a cinco horas e 47,88%, tempo menor que trinta minutos, demonstrando assim a má qualidade higiênica, fato esse atribuído a falta de conhecimentos, a não utilização do resfriamento e transporte inadequado.

Nader Filho et al.(1983), realizaram um estudo comparativo entre a prova de redutase, contagem em placas e contagem leucocitária em amostras de leite "in natura", oriundas de vacas positivas ao California Mastitis Test (CMT). Os autores verificaram haver uma provável

interferência dos leucócitos quando presentes no leite em número elevado, de modo a abreviar o tempo de redução do azul de metileno. Entretanto, esse fato não invalida a utilidade do teste de redutase na rotina do Serviço de Inspeção, uma vez que as variações observadas ocorreram no sentido de colocar fora dos padrões regulamentares, um produto considerado impróprio para consumo.

Castro et al. (1977) aplicaram a dupla redutase para determinar a verdadeira qualidade do leite de consumo, com a finalidade de evidenciar a presença de inibidores bacterianos, originários de resíduos químicos da higienização de equipamentos, antibióticos e outros utilizados na terapêutica veterinária, principalmente nas mastites, ou da adição fraudulenta de conservadores; e verificaram que os inibidores presentes atuaram sobre a flora do leite, retardando a redução do azul de metileno, fazendo crer se tratar de produto de boa qualidade higiênica. Entretanto, estes pesquisadores relatam que sempre que houve indícios da presença de inibidores, as amostras foram submetidas a outras provas como as que pesquisam antibióticos, amônio quaternário, formaldeído e peróxido de hidrogênio.

Estudos realizados por Pedraza et al. (1978), mostraram o grau de contaminação bacteriana no leite após sua passagem pelo equipamento de ordenha mecânica, o efeito do resfriamento e o efeito do período de armazenagem; utilizando-se a determinação de acidez, pH, tempo de redução do azul de metileno (TRAM) e contagem em placas. Concluíram que o método de redução do azul de metileno é de grande valor, para se medir a qualidade bacteriológica do

leite cru, e que há uma alta correlação entre o teste de redução do corante e a contagem bacteriana.

Alcock et al. (1987), utilizaram o teste de redução do azul de metileno para avaliar a contaminação microbiana em ervilhas congeladas. Os resultados, considerados satisfatórios, mostraram que o teste, pode ser recomendado para monitorar a higiene em vegetais congelados.

Santos et al. (1984), conduziram um estudo, com a finalidade de comparar redutase e contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios. Os resultados obtidos pelos pesquisadores, indicou uma correlação alta entre as metodologias, diante do coeficiente de correlação de 0,756, altamente significativo, segundo sua avaliação.

De acordo com Behmer (1984), o leite pode ser classificado nas seguintes categorias:

- 1^a. Classe- Leite bom: descolore em 5hs e 30 minutos, em banho termo estabilizado a 37^oC, e contém menos de 500 000 germes/mL.
- 2^a. Classe- Leite regular: descolore entre 2 a 5hs e 30 minutos, e contém de 500 000 a 4 milhões de germes/mL.
- 3^a. Classe- Leite péssimo: descolore em menos de 20 minutos, e contém mais de 20 milhões de germes/mL.

2.8 Novos métodos para contagem de microrganismos

Os métodos rápidos em Microbiologia, surgidos a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para obtenção dos resultados analíticos e melhorar a produtividade no laboratório, estão

ganhando cada vez mais aceitação, pois simplificam as tarefas, e em alguns casos, reduzem o custo e são mais sensíveis e específicos que os métodos tradicionais (Hajdenwurcel, 1999).

Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidos uma série de novos métodos de análise microbiológica de alimentos, muitos dos quais encontram-se aprovados ou em estágio final de aprovação oficial, por órgãos reguladores internacionais. No Brasil, até o momento, a adoção oficial de novos métodos está regulamentada pela Portaria N.451 /97 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL), que a condiciona à inclusão no Bacteriological Analytical Manual (BAM), editado pela Food and Drug Administration (FDA) norte-americana, ou no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, editado pela American Public Health Association (APHA), também norte-americana (Silva et al., 1997).

O sistema Petrifilm pode ser usado com substâncias não seletivas, com a finalidade de se contar aeróbios em placas, e com substâncias seletivas, para se detectar grupos específicos de microrganismos. O uso deste método, indica uma aceitável alternativa para contagem de microrganismos em placas, com aprovação da AOAC (Jay, 1998).

Com o surgimento de vários sistemas alternativos para quantificação rápida da carga microbiana em alimentos, houve a necessidade de se fazer um estudo comparativo desses novos sistemas, incluindo as placas Petrifilm (Franco, 1994).

Ginn et al. (1984), avaliaram a aplicação do sistema Petrifilm para determinar o número de microrganismos em leite cru. De acordo com os pesquisadores, os procedimentos estatísticos sugeriram que o sistema Petrifilm é uma alternativa conveniente para leite cru.

Smith et al. (1985), compararam o sistema Petrifilm com a metodologia tradicional para enumerar microrganismos aeróbios mesófilos, em carne fresca. Os resultados mostraram um índice de correlação de 0,963. Para os pesquisadores estas análises indicaram que o sistema Petrifilm poderia ser utilizado como uma possível alternativa para contagem de microrganismos aeróbios.

McGoldrick & Mc Allister (1986) relataram resultados referentes ao emprego de placas Petrifilm, para detecção de contaminação, em superfícies de contato com alimentos. Devido às suas características peculiares, estas placas podem substituir com vantagens outros tipo de procedimentos que são utilizados na amostragem de superfícies. O estudo foi conduzido com utensílios de cozinha (bandejas de aço inoxidável e de fibra de vidro) artificialmente contaminados com *B. subtilis*, *Pseudomonas fragii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, obtendo-se elevados índices de correlação com os métodos convencionais, apontando para valores entre 0,880 e 0,997.

Restaino & Lyon (1987) propuseram-se a investigar a eficácia do sistema Petrifilm para enumerar coliformes e *E.coli* em carne crua congelada. De acordo com estes pesquisadores, o sistema Petrifilm mostrou ser uma

confiável metodologia para enumeração dos referidos microrganismos.

Beuchat et al. (1990), fizeram uma avaliação do sistema Petrifilm para enumerar fungos e leveduras em alimentos com alta acidez. Estes pesquisadores encontraram coeficientes de correlação bastante satisfatórios, entre 0,993 e 0,995, os quais permitiram verificar a alta precisão da metodologia.

Diferenças insignificantes foram encontradas por Ingham & Moody (1990), ao analisarem contaminação em carne de caranguejo. Comparando os resultados fornecidos pelo sistema Petrifilm e contagem de aeróbios totais, encontraram alta correlação entre as metodologias utilizadas, entre 0,996 e 0,998.

Chain & Fung (1991), compararam a eficiência dos sistemas Redigel, Petrifilm, Isogrid, plaqueamento em espiral e sistema convencional de plaqueamento, na enumeração de bactérias aeróbias em vários alimentos como peito de frango, carne moída crua, carne de porco, tomilho e farinha de trigo. Os resultados indicaram que os cinco métodos eram equivalentes, obtendo-se coeficientes de correlação que variaram entre 0,999 e 0,994. Resultados muito próximos foram obtidos por Cormier et al. (1993) ao trabalharem com produtos marinhos. Os coeficientes de correlação, alcançaram valores entre 0,860 a 0,990.

Byrne & Bishop (1991), observaram que as placas Petrifilm para contagem de bactérias totais eram também convenientes para a enumeração de bactérias termodúricas em leite cru, principalmente espécies de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Micrococcus*, que indicam

práticas higiênicas inadequadas e conseqüentemente, comprometimento da vida útil do leite após a pasteurização.

Chain & Fung (1991), citam que o propósito de se comparar os sistemas Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid e Contagem de microrganismos aeróbios em placa, para determinação do número de bactérias em alimentos selecionados, era apurar e conhecer as vantagens e desvantagens ao aplicar esta metodologia.

Wakabayashi & Miyao (1993), compararam os sistemas Petrifilm, plaqueamento em espiral, Pro.media™ para enumeração de bactérias aeróbias totais e coliformes em vegetais fermentados, verificando coeficientes de correlação entre 0,880 e 0,998 entre esses métodos.

Beuchat et al. (1998), analisaram amostras de diversos alimentos com a finalidade de comparar sistema Simplate, com Petrifilm, Redigel e metodologia convencional para enumeração de microrganismos aeróbios. Nesta pesquisa concluíram que os sistemas empregados foram equivalentes para estimar microrganismos nos alimentos.

Franco(1994) ao analisar vários trabalhos, verificou que o sistema Petrifilm não é uma metodologia rápida no sentido de fornecimento mais rápido de resultados quando comparado aos métodos de plaqueamento convencionais. Esta pesquisadora esclarece que o sistema Petrifilm se constitui, basicamente, em um método de execução rápida, com a vantagem de ser facilmente realizada e dispensar o uso de equipamentos laboratoriais especiais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

Leite cru refrigerado

Para execução deste experimento foi utilizado leite cru refrigerado, obtido no departamento de Produção Animal da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP; no período de Junho a Novembro de 2000.

3.1.2 Meios de cultivo, placas, corante e vidraria

. PCA (Plate Count Agar- Difco)

. VRBA (Violet Red Bile Agar- Merck)

.placas Petrifilm para contagem de microrganismos aeróbios totais em alimentos, e para contagem de coliformes totais, da 3M do Brasil.

. solução de azul de metileno a 0,0044% em pH 6,22; conforme recomendações do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1978).

3.1.3 Equipamentos

- . Balança digital MARTE
- . Estufa incubadora, 35°C e 37°C+- 1,0
- . Estufa de esterilização
- . Autoclave
- . Contador de colônias tipo Quebec
- . Medidor de pH Digimed
- . Vidraria de uso rotineiro em laboratório

3.2 Obtenção e preparo das amostras

Foram analisadas 64 amostras, sendo estas coletadas semanalmente, em frascos esterilizados pirex, com tampa rosqueável. Após as coletas no tanque de refrigeração, as amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório de laticínio do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, em embalagem de isopor contendo cubos de gelo.

3.3 Análises Microbiológicas

3.3.1 Teste de redutase

O Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A. P.H.A., 1978), determina que 9mL de leite deve ser pipetado em tubo de ensaio com tampa, esterilizado, e em seguida transfere-se 1mL da solução do azul de metileno a 0,0044%, homogeniza-se e incuba-se a 37°C± 1,0°C, até a

mudança de cor. Faz-se a leitura a intervalos regulares até a descoloração total da amostra. O tempo gasto é o tempo de redutase.

3.3.2 Contagem total de mesófilos aeróbios pelo sistema Petrifilm

Amostras de leite cru foram homogeneizadas no próprio frasco de coleta, no qual o leite foi coletado e alíquotas de 1,0 mL de cada amostra, foram retiradas para proceder às diluições em série até 10^{-5} . Um mL das diluições -3, -4 e -5 foram transferidas para placas Petrifilm. Em seguida as placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ por 48h.

3.3.3 Contagem de coliformes totais pelo sistema Petrifilm

Para contagem de coliformes totais, alíquotas de 1,0 mL das diluições -2, -3 e -4, foram transferidas para as placas Petrifilm; em seguida, incubadas a $35,0^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $48\text{h} \pm 3\text{h}$.

3.3.4 Plaqueamento em profundidade

3.3.4.1 Contagem de microrganismos aeróbios totais em PCA

A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, foi realizada, utilizando-se Ágar Padrão (Plate Count Agar (Difco); as placas foram incubadas a $32^{\circ}\text{C}/48\text{ hs}$ (Speck, 1984).

Após a homogeneização da amostra, foi feita diluição em série em água peptonada (0,1%) e as diluições, 10^3 , 10^4 , 10^5 , foram plaqueadas.

3.3.4.2 Contagem de coliformes totais em VRBA

Foi utilizado Ágar Cristal Vermelho Neutro Bile (Merck); diluições 10^2 , 10^3 e 10^4 , foram plaqueadas e em seguida, estas placas foram submetidas a incubação por 24hs a 32°C , como recomendado pela literatura (Hitchins et al., 1992).

3.4 Análise Estatística

De acordo com Standard Methods for the Examination Dairy Products (A.P.H.A., 1978), o tempo de redução do corante por microrganismos, deve ser inversamente proporcional à população bacteriana. Sob esta hipótese, fez-se um estudo de correlação linear entre os resultados obtidos pelos métodos, **como recomenda o ??????**.

3.4.1- Diagrama de dispersão

Inicialmente fez-se um diagrama de dispersão (scatterplot), que é a plotagem de uma variável versus a outra:

- tempo de redução X n° de microrganismos totais, determinados em PCA;
- tempo de redução X n° de microrganismos totais, determinados em Petrifilm;

- tempo de redução X nº de microrganismos totais, determinados em Petrifilm;
- tempo de redução X nº de coliformes totais, determinados em VRBA;
- tempo de redução X nº de coliformes totais, determinados pelo sistema Petrifilm.

3.4.2 Coeficiente de Correlação Linear (r)

A medida utilizada para a correlação linear é o coeficiente de correlação r , que indica o grau de intensidade da correlação entre duas variáveis e, ainda, o sentido dessa correlação (positivo ou negativo).

Foi usado o coeficiente de correlação de Pearson (Christensen, 1996).

$$r = \frac{n \sum x_i y_j - (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{[n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2][n \sum y_j^2 - (\sum y_j)^2]}}$$

onde n , é o número de observações; x_i e y_j são, respectivamente, os pares de valores das duas variáveis que estão sendo comparadas. No caso, tomou-se o tempo de redução como x_i e o número de microrganismos totais, coliformes totais como y_j .

Os valores limites de r são -1 e +1, isto é, o valor de pertence ao intervalo [-1;+1]. Assim:

- Se $r = +1$, há uma correlação perfeita e positiva entre as variáveis.
- Se $r = -1$, há uma correlação perfeita e negativa entre as variáveis.

c) Se $r = 0$, ou não há correlação entre as variáveis ou a relação que por ventura exista, não é linear.

3.4.4 Teste de significância para ρ ($r = \rho$)

Para se poder fazer uma inferência desse resultado para a população, isto é, verifica se os dados colhidos não são apenas resultados de um determinado momento experimental; para tanto, é necessário se proceder a um teste de significância, onde: ρ é o coeficiente de correlação da população e r , o da amostra obtida.

A variável do teste é:

$$t_{obs} = \frac{\sqrt{n-2}r}{\sqrt{1-r^2}} \sim t_{(n-2;\alpha)}$$

ou seja, o valor de t observado, será comparado com um valor tabelado a um nível α de erro e os graus de liberdade associados às duas variáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivou-se, correlacionar contagem total em PCA (Plate Count Agar), contagem total em Petrifilm, contagem de coliformes totais em VRBA (Violet Red Bile Agar) e em Petrifilm, com o tempo de redução do azul de metileno (solução a 0,004%). Analisaram-se 64 amostras de leite refrigerado, coletados semanalmente, junto ao Departamento de Produção Animal/ ESALQ-USP.

O teste de redutase, técnica tradicionalmente empregada em laticínios, é importante, justamente porque é desclassificatório. O ponto de viragem do teste foi acompanhado desde os primeiros minutos, até completar 6 horas. Esta observação ocorreu a cada meia hora, com delicada inversão dos tubos durante a leitura.

Foi feito o estudo das correlações entre os métodos empregados, dos valores obtidos para os diversos parâmetros pesquisados, com e sem transformação $\log_{10}$. Estes resultados são apresentados nas tabelas, de 1 a 4.

As figuras 1 e 2, mostram o diagrama de dispersão dos valores obtidos para contagem de microrganismos totais com e sem transformação em $\log_{10}$ (Tabela 1). O coeficiente de correlação entre o tempo de redução e o número de microrganismo totais (UFC/mL) em P.C.A., sem transformação foi de $r = -0,7957$ e, para os valores transformados foi de $r = -0,9339$.

Figura 1- Diagrama de dispersão de Redutase X microrganismos totais (PCA)

$$r = -0,7957$$

Figura 2- Diagrama de dispersão de Redutase X Log microrganismos totais (PCA)

$$r = -0,9339$$

Estes números evidenciam uma forte correlação entre as metodologias, como já proposto pelo Standard Methods for Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1978), e além disso

indica que, a medida que aumenta o tempo de redutase, diminui a população bacteriana.

De acordo com Nader Filho et al. (1983) as possíveis variações que podem ocorrer entre a prova de redutase e a contagem de microrganismos totais, podem estar relacionadas à presença de um número elevado de leucócitos em leites oriundos de vacas "California Mastitis Test" positivos, o que pode explicar em parte as variações observadas entre o tempo de redução (redutase) e a contagem total encontrados nesta comparação. Também Pedraza et. al. (1978), Santos et al. (1984), encontraram alta correlação entre o teste de redutase, e a contagem total bacteriana em leite cru, valores atingindo -0,756.

Para contagem total em Petrifilm e tempo de redução (redutase) mostrada na Fig. 3 e 4, o coeficiente de correlação para os valores sem transformação (Tabela 3) foi de $r = -0,7868$ e, com transformação de números total de microrganismos (UFC/mL), foi $r = -0,9302$. Isto indica, portanto, uma forte correlação entre as duas metodologias.

Figura 3- Diagrama de dispersão de Redutase X microorganismos totais (Petrifilm)
 $r = -0,7867$

Figura 4- Diagrama de dispersão de Redutase X Log microorganismos totais (Petrifilm).
 $r = -0,9302$

Estes resultados concordam com aqueles encontrados por Ginn et al.(1984), os quais sugeriram a aplicação da

sistema Petrifilm para determinar o número de microrganismos totais em leite cru e que este método é uma alternativa conveniente para análise de leite cru.

O sistema Petrifilm foi considerado por Smith et. al. (1985) como uma alternativa para a enumeração de microrganismos aeróbios em carne fresca, com um coeficiente de correlação de $r = -0,963$. quando comparado com o sistema convencional.

O diagrama de dispersão do tempo de redução X coliformes totais (UFC/mL) em VRBA é mostrada nas Fig. 5 e 6, para as contagens de coliformes totais sem transformação e transformados em $\log_{10}$. O coeficiente de correlação entre o tempo de redução (redutase) e o número de coliformes totais foi de $r = -0,7077$ e $r = -0,7710$, respectivamente.

Figura 5- Diagrama de dispersão de Redutase X coliformes totais (VRBA)
 $r = -0,7077$

Figura 6- Diagrama de dispersão de Redutase X Log coliformes totais (VRBA)

$$r = -0,7710$$

Figura 7- Diagrama de dispersão de Redutase X coliformes totais (Petrifilm)

$$r = -0,7073$$

Figura 8- Diagrama de dispersão de Redutase X Log coliformes totais (Petrifilm)

$$r = -0,7710$$

Os diagramas de dispersão para os valores de contagem de microrganismos totais com e sem transformação para $\log_{10}$ estão representados nas Figuras 9 e 10 respectivamente.

As correlações encontradas entre contagem em PCA e o sistema Petrifilm, $r = -0,9682$, para os valores não transformados, e $r = -0,9820$ quando se transformou em $\log_{10}$, indicam que essas técnicas podem ser usadas para esse tipo de análise.

Autores como Smith et. al.(1985), Ingham & Moody(1990), comparando as metodologias, para contagem total em outros alimentos, também encontraram altas correlações entre elas, comprovando assim a viabilidade do uso do sistema Petrifilm para a enumeração de microrganismo aeróbios totais.

Figura 9- Diagrama de dispersão de microrganismos totais (Petrifilm) X microrganismos totais (PCA)

$$r = 0,9682$$

Figura 10- Diagrama de dispersão: Log microrganismos totais (Petrifilm) X Log microrganismos totais (PCA)

$$r = 0,9820$$

As correlações encontradas para contagem de coliformes totais, tanto em VRBA como em Petrifilm, valores não transformados e transformados em $\log_{10}$, é apresentada nos diagramas de dispersão das Fig. 11 e 12, respectivamente.

Figura 11- Diagrama de dispersão: Coliformes totais (Petrifilm) X coliformes totais (VRBA)

$$r = 0,8380$$

Neste caso, também houve uma forte correlação entre as duas metodologias, isto é, $r=0,8380$ e $r=0,9236$, mostrando portanto, a correspondência entre as duas metodologias., o que concorda com Restaino & Lyon (1987); que investigando o sistema Petrifilm para enumerar coliformes totais e *E.coli* em carne crua congelada, concluíram ser esta uma metodologia confiável para a enumeração dos referidos microrganismos.

Figura 12- Diagrama de dispersão: Log coliformes totais (Petrifilm) X Log coliformes totais (VRBA)

$$r = 0,9236$$

5 CONCLUSÕES

As análises de correlações entre as metodologias para contagem total e de coliformes totais, levam às seguintes conclusões:

- As metodologias avaliadas foram equivalentes para se estimar tanto o número de microrganismos aeróbios totais como para a contagem de coliformes totais e leite cru refrigerado.
- Considerando a boa correlação entre as metodologias avaliadas e que o sistema Petrifilm é de execução mais rápida e não exige equipamentos específicos, este pode ser indicado com vantagens para as análises de rotina nas indústrias de laticínios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJZENTAL, A. Caminhos do leite: da ordenha ao consumidor. **Leite e Derivados**, n. 18, p. 29-40, 1994.

ALCOCK, S.J.; HALL, L.P.; BLANCHARD, J.H. Methylene blue test to assess the microbial contamination of frozen peas. **Food Microbiology**, v.4, n.1, p.3-10, 1987.

ALMEIDA, A.A., FURTADO, J. Microrganismos psicrotroficos em leite. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.48, n.287, p.36-40, 1993.

AMARAL, S.H.O.M. do. Influência da espécie bacteriana e da temperatura da amostra no teste de redutase para leite, com azul de metileno e rezasurina. Piracicaba, 1985, 104p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade De São Paulo.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 14 ed.. Washington, 1978.

- ANTUNES, L.A.F.; OLIVEIRA, J.S. Qualidade microbilógica do leite cru. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.41, n.244, p.20-24, 1986.
- ASHTON, T.R. Some bacteriological aspects of the deterioration of pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, v.17, p.261-287, 1992.
- BARKWORTH, H; IRWIN, J.O.; MATTICK, A.T.R. The plate count and methylene blue reduction test applied to milk, **Journal of Dairy Research**, v.13, p.265-314, 1942.
- BARROS, V.R.M.; PANETTA, J.C., PERCES, E.M.C. Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite na capital de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.3, p. 199-207, 1984.
- BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. 13.ed. São Paulo: Nobel, 1984 cap.6, 55-58: Método de redutase.
- BERMUDEZ, J.; BONILLA, M.; DEL-BAGLIVI, L.P.; LABORDE, M. Estudio sobre la calidad higiénica da la leche cruda recibida en plantas lecheras. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.18, n.4, p.175-178, 1976.
- BEUCHAT, L.R.; NAIL, B.V.; BRACKETT, R.E.; FOX, T.L. Evaluation of a culture fim (PetrifilmTM YM) method for enumerating yeasts and molds in selected dairy and high-acid foods. **Journal of Food Protection**, v.53, n.10, p.869-874, 1990.

BEUCHAT, L.R.; COPELAND, E.; CURIALE, M.S.; DANISAVICH, T.; GANGAR, V.; KING, B.W., LAWLIS, T.L.; LIKIN, R.O.; OKWUSOA, J.; SMITH, C.E.; TOWNSEND, D.E. Comparison of the Simplate™ and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.1, p.14-18, 1998.

Bishop, J.R.; White, C.H. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. **Journal of Food Protection**, v.48, n. 8, p.663-667, 1988.

BOCKELMANN, I.V. Aspectos da produção higiênica do leite.² In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 4, Juiz de Fora, 1977. Anais. Juiz de Fora: EPAMIG, 1977. p.317-320.

BOURGEOIS, C.M. In: **Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires**. 2.ed., Paris: Lavoisier-Tec & Doc, , 1990. p.4-13: La microflore aérobie mésophile totale.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, 1993 p.11937-11960.

BRAZIS, A.R. Methods for assessing the bacteriological quality of raw milk from the farm. Plate count method. Bulletin of the International Dairy Federation, n.256, p.4-8, 1991.

- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's Manual.** Determinative bacteriology, 8ed. Baltimore: The Williams and Wilkins. 1974. 1268p.
- BYRNE J.R.; BISHOP, J.R. Evaluation of a dry medium culture plate (3M Petrifilm AC) laboratory pasteurized counts. **Journal Food Protection**, v.54, n.4, p.308-309, 1991.
- CASTRO, L.S.; MELLO, A.F.; GENTILIN, J.A.; XAVIER, A.J. Dupla redutase na determinação da verdadeira qualidade do leite de consumo. **Revista de Microbiologia**, v.8, n.2, p.43-45, 1977.
- CHAIN, V.S.; FUNG, D.Y.C. Comparison of Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid, and aerobic plate count for determining the numbers of aerobic bacteria in selected foods. **Journal of Food Protection**, v.54, n.3, p. 208-211, 1991.
- CHRISTENSEN, R. Analysis of variance, design and regression. 1ed. USA. Ed.Chapman & Hall, 1996. 587p.
- COLLINS, E.B. Heat resistance psychrotrophic microorganisms. **Journal Dairy Science**, v. 64, p. 157-160, 1981.

CORMIER, A.; CHIASSON, S.; LEGER, A. Comparison of maceration and enumeration procedures for aerobic count in selected seafoods by standard method, Petrifilm™, Redigel™ and Isogrid. **Journal Food Protection**, v.56, n.3, p.249-251, 1993.

CRAVEN, H.M.; MACAULEY, B.J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. **Journal of Dairy Techonology**, v.47, n.1, p.50-55, 1993.

FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria their production, properties, effects control. **Journal of Dairy Research**, v.53, n.1, p.139-177, 1986.

FIGUEIREDO, R.M. de. Ocorrência de Coliformes e Estreptococos fecais em alimentos com baixo teor de umidade. Piracicaba 1991. 77p. Dissertação Tese(Mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.

FOSTER, E.M. **Microbiologia de la leche**. México: Editorial Herrero, 1957. 490p.

FOSTER, E.M.; **Dairy microbiology**, New Jersey: Prentice Hall, 1957. 210p.

FRANCO, B.D.M.G. Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias. São Paulo, 1994.128p..Tese(Livre-docência)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

FRAZIER, W.C.; Westhoff, D.C. **Microbiología de los alimentos**. 4ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 677p.

FRANKLIN, J.G. The effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Dairy Industry**, v.30, n.1, p.46-50, 1965.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R.; LUQUETTI, B.C.; MARTINS, I.P.; SILVA, R.T.; VIEIRA, R.C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite "in natura". **Higiene Alimentar**, v.11, n.70, p.36-50, 2000.

GALLO, C.R. Estudo da microflora de derivados do leite como índice de qualidade. Piracicaba, 1978, 93p. Dissertação (Mestrado)-. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GEHRIGER, G. Multiplication of bacteria in milk during farm storage. **Bulletin of the IDF**, v.256, p.1-62, 1991.

GERMANO, P.M.L., GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, v.9, n.36, p.12-16, 1995.

GINN, R.E.; Packard, V.S.; Fox, T.L. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (PetrifilmTM SM) method for determining numbers of bacteria in raw milk. **Journal of Food Protection**, v.47, n.10, p.753-755, 1984.

GOMES, M.I.F.V. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. Piracicaba, 1988 73p. Dissertação(Mestrado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.

GOLDONI, J.S.; OLIVEIRA, A.J.; BONASSI, I.A.; GIL, A.R. Microbiologia do leite. I. Flora microbiana do leite pasteurizado consumido em Botucatu (SP). In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS DO INSTITUTO...DE...LATICÍNIOS "Cândido Tostes"; 4., Juiz de Fora: Anais EPAMIG, 1977. p.144-149.

GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPS, J.D. Effect of aeration on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic growing in milk during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v.47, n.9, p.697-702, 1984.

HAJDENWURCEL, J.R. Adaptação das indústrias às metodologias microbiológicas estabelecidas pela FIL/IDF. **Indústria de Laticínios**, n.13, p.53-55, 1999.

HARMON, R.J. Coliform mastitis, a challenge for dairymen and researchrs, **Dairy and Food Sanitation**, v.4, n.1, p.4-6, 1984.

HASKEN, S. Preço e qualidade do leite: da ordenha ao consumidor. **Leite e Derivados**, n.18, p.29-40, 1994.

HITCHINS, A.D., HARTMAN, P.A.; TODD, R.C.D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3ed. Washington: American Public Health Association, 1992, 1219p.

HOBBS, B.C.; GILBERT, J. Microbiological counts in relation to food poisoning. IV International Congress **Food Science and Technology** III: P.159-169, 1974.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. **Journal Dairy Science**, v.72, n.6, p. 1547-1556, 1989.

HÜHN, S.; HAJDENWURCEL, J.R.; MORAES, J.M.; VARGAS, O.L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha mecânica e ao chegar à plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.35, n.209, p.3-8, 1980.

INGHAN, S.C.; MOODY, M.W. Enumeration of aerobic plate count and E.coli during blue crab processing by standard method, Petrifilm and Redigel. **Journal of Food Protection**, v.53, n.10, p. 423-424, 1990.

INTERNATIONAL COMMISSION on MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS: **Microrganisms in foods** 1. 2ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. 434p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microbial ecology of foods. New York: Academic Press, 1978. 434p.

ITURRINO-SCHOCKEN, R.P.; NADER, A.F.; ÁVILA, F.A.; MONTANHOLI, R.A. Efeito de várias medidas higiênico-sanitárias durante a ordenha na contagem microbiana do leite. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.37, n.219, p.13-25, 1982.

JAWETZ, E. **Microbiología médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1970. 210p.

JAY, J.M. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3ed. Washington, American Public Health Association, 1992, 1219p.

JAY, J.M. . **Modern food microbiology**. 5.ed. Maryland: Aspen Public Health Association, 1998a. p?, : Culture microscopic and sampling methods.

KITCHEN, J.B. Review of the progress of Dairy Science: bovine mastitis milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v.48, n.1, p.167-188, 1981.

LANARA. **Métodos Analíticos Oficiais para Contrôlo de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes.** Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.p.30.

LUCK, H.; CLARK, P.C.; GROENEVELD, H.T. The suitability of dye reduction testes for estimating the bacterial quality of bulk-cooled milk. **Agroanimalia**, v.2, n.51, p.69-76, 1970.

MACHADO, E.S.V. Flora dominante do leite cru e pasteurizado. Faculdade de Tecnologia de Alimentos , 1975. 39p. Dissertação(Mestrado)- Universidade Estadual de Campinas.

MADIEDO, P.R.; GANCEDO, J.C.B.; ALONSO, L.; GAVILÁN, C.G.R. Afuega'l pitu cheese quality: carbon dioxide adition to refrigerated milk in acid-coagulated cheese making, **International Dairy Journal**, v.8, n.12, p.9-17, 1998.

McGOLDRICK, K.F,; MCALLISTER, J.S. Dry medium for detecting contamination on surfaces. **Food Technology**, v.40, n.4, p.77-80, 1986.

MERCK & Co. Inc. **The Merck Index.** New York. Rahway, 1960. 268p.

MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S.; SALVA, T.J.G.; VANDENDER, A.G.F.; W., b.; MACHADO, R.C. Qualidade microbilógica de leites pasteurizados produzidos no estado de São Paulo. **Indústria de Laticínios**, n.13, p.56-61, 1999.

- MORSE, P.M.; JACKSON, H.; McNAUGHTON, C.H.; LEGGAT, A.G.; LANDERKIN, G.B.; HOHNS, C.K. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.51, n.8, p.265-269, 1970.
- MUTUKUMIRA, A.N.; FERESU, S.B.; NARVHJ, J.A.; ABRAHAMSEN, R.K. Chemical and microbiological quality of raw milk, produce by small holder farmer. **Journal of Food Protection**, v.59, n.8, p.984-987, 1996.
- NADER Filho, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; Fukuda, S.P. Estudo comparativo entre a prova de redutase, contagem padrão em placas e contagem leucocitária. Leite "in natura" procedente de vacas não reagentes ao Califórnia Mastitis (CMT). **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.38, n.230, p.19-22, 1983.
- NASCIMENTO, G.G.F., FIGUEIREDO, S.H.M., UBISSES, D.M., ANTONELLI, E.M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado em Piracicaba. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.25, p.13-21, 1991.
- NEDER, R.N. Microrganismos psicrótróficos. **Microbiologia de Alimentos** I. Piracicaba: ESALQ, 1992. 149p.
- OLIVEIRA, J.S. Qualidade microbiológica de leite. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.31, n.186 p.15-20, 1976.

OLIVEIRA, A.J.; CARUSO, J.G.B. **Leite-Obtenção e qualidade do produto fluido e derivados**.2.ed. Piracicaba: Fealq, 1996 cap.3, p.27-43: Contrôles de qualidade do leite.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p.10-21, 1999.

PANETTA, J.C. Higiene: qualidade do leite de consumo e fatores interferentes. **Leite e Derivados**, v 111, n.13, p.34-39, 1993.

PEDRAZA, C.; ROMERO, J.J.; ARGREAVES, A.H. Efecto del paso de la leche por el equipo de ordeño mecánico, del enfriamiento y del tiempo de almanecaye, sobre su calidad bacteriológica. **Agricultura Técnica**, v.38, p.156-160, 1978.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; JORGE, A.F.L. Variação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação de qualidade. **Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.35-38, 1999.

PRATA, L.F.; FUKUDA, S.P.; MARTINS, L.S.; FIGUEIREDO, S.F. Influência da coleta a granel, em dias alternados, sobre a qualidade do leite cru mantido sob refrigeração na fazenda. **Higiene Alimentar**, v.10, n.45, p.29-34, 1996.

RAVANIS, S.; LEWIS, M.J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, n.3, p.164-167, 1995.

RESTAINO, L.; LYON, H.R. Efficacy of PetrifilmTM VRB for enumeration Coliforms and *Escherichia coli* from frozen raw beef. **Journal of Food Protection**, v.50, n. 12, p.1017-1022, 1987.

RICHTER, R.L., LEDFORD, R.A.; MURPHY, S.C. **Compendium of methods for the examination of foods**. 3.ed Washington: American Public Health Association, 1992, p.532-540: Milk and milk products.

Rogick, F.A. Produção higiênica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 36, n.219, p.33-35, 1981.

SANTOS. E.C. Aspectos sanitários na produção do leite de consumo. **Revista Boletim do Leite**, n.522,p.13-23, 1972.

SANTOS, E.C.; VILELA, A.M.; SOUZA, M.H. Estudo microbiológico do leite para avaliação comparativa das provas de redutase e contagem global. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.39, n.230, p.3-5, 1984.

SILVA, N.; JUNQUEIRA,V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997, cap.20, p.157-162: Novos métodos de análises microbiológicas de alimentos.

SILVEIRA, I. A., CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA,D. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

SMITH, L.B.; FOX, T.L.; BUSTA F.F. Comparison of a dry medium culture plate(Petrifilm SM Plates) method to the aerobic plate count method for enumeration of mesophilic aerobic colony-forming units in fresh ground beef. **Journal of food protection**, v.48,n.12, p.1044-1045,1985.

SMYTHE, V.R. Sources of milk contamination of farms. **Dairy Science Abstract**, v.23, n.3, p.26-36, 1960.

SMITH, W.H. **Principles of biochemistry**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 1964. 308p.

SOLBERG, T.S.; SINHA, R.N. Methods for assessing the bacteriological quality of cooled bulk milk from the farm. **International Dairy Federation Annual Bulletin**, v. 83, p.1-19, 1974.

SOUZA, G. Acidez e qualidade do leite após ordenha: um conjunto de fatores- Parte II. **Indústria de Laticínios**, n.22, p.68-73, 1999.

SOUZA, H.M. Influência da mamite na qualidade biossanitária e tecnológica do leite. **Informe Agropecuário**, v.13, n. 155, p.11-18, 1988.

SPECK, M.L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

SPREER, E. Lactologia industrial. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 1991.p.325.

TAVARES, S.G. Avaliação das condições microbiológicas do leite pasteurizado tipos A, B e C, comercializados na cidade de Piracicaba, SP, 1996.84p. Dissertação(Mestrado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

TOWNSEND, D.L.; IRVING, R.L.; NAQUI, A. Comparison of the Simplate coliform and *Escherichia coli* test with Petrifilm, three-tube MPN, and VRBA + MUG methods for enumerating coliforms and E. coli in food. **Journal of Food Protection**, v.54, n.3, p.208-211, 1998.

VARGAS, O.L. A comercialização de leite cru e a segurança do consumidor. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.50, n.291, p.3-17, 1995.

WAKABAYASHI, W.; MIYAO, S. Evaluation of the Petrifilm SM, Spiral plating, Pro.media MT-21 and Colilert methods for obtaining bacterial and total coliforms counts in pickled vegetables. **Journal of Food Protection**, v.40, n.5, p.348-352, 1993.

WEBER, F. Curd drainage coagulum obtained by acidification. In: ECK, A. **Cheesemaking science and technology**. New York: Lavoisier Publication, 1986.189p.

ZALL, R.R.; CHEN, J.H., MURPHY, S.C. Effect of a refrigerated milk receiver on raw milk quality. **Dairy and Food Sanitation**, v.3, n.11, p.408-414, 1983.

APÊNDICE

Tabela 1- Dados obtidos do tempo de redução (redutase, em minutos), microrganismos totais e logaritmo dos dados microrganismos totais, em PCA.

Repeti- ções	Redutase (min.)	Micr. tot. (UFC/mL)	Log micr. tot. (UFC/mL)	Repeti- ções	Redutase (min.)	Micr. tot. (UFC/mL)	Log micr. tot. (UFC/mL)
1	330	1210000	6,0828	33	350	87000	4,9395
2	330	910000	5,959	34	350	58000	4,7634
3	330	900000	5,9542	35	350	55000	4,7404
4	330	800000	5,9031	36	350	44000	4,6435
5	330	750000	5,8751	37	350	11000	4,0414
6	330	580000	5,7634	38	355	76000	4,8808
7	330	290000	5,4624	39	360	85000	4,9294
8	335	1100000	6,0414	40	360	70000	4,8451
9	335	380000	5,5798	41	360	43000	4,6335
10	335	220000	5,3424	42	360	33000	4,5185
11	340	690000	5,8388	43	360	33000	4,5185
12	340	630000	5,7993	44	360	31000	4,4914
13	340	620000	5,7924	45	360	30000	4,4771
14	340	620000	5,7924	46	360	30000	4,4771
15	340	580000	5,7634	47	360	30000	4,4771
16	340	500000	5,699	48	360	23000	4,3617
17	340	400000	5,6021	49	360	20000	4,301
18	340	400000	5,6021	50	360	19000	4,2788
19	340	400000	5,6021	51	360	18000	4,2553
20	340	400000	5,6021	52	360	17000	4,2304
21	340	350000	5,5441	53	360	17000	4,2304
22	340	330000	5,5185	54	360	15000	4,1761
23	340	270000	5,4314	55	360	12000	4,0792
24	340	260000	5,415	56	365	2700	3,4314
25	340	250000	5,3979	57	370	18000	4,2553
26	340	230000	5,3617	58	370	1900	3,2788
27	340	210000	5,3222	59	370	5000	3,699
28	340	210000	5,3222	60	370	2600	3,415
29	345	500000	5,699	61	370	2600	3,415
30	345	200000	5,301	62	375	2500	3,3979
31	345	170000	5,2304	63	375	2000	3,301
32	350	310000	5,4914	64	376	5900	3,7709

Tabela 2- Dados obtidos do tempo de redução (redutase, em minutos), coliformes totais e logaritmo dos dados de coliformes totais, em VRBA.

Repetições	Redutase (min.)	Colif. tot. (UFC/mL)	Log colif. tot. (UFC/mL)	Repetições	Redutase (min.)	Colif. tot. (UFC/mL)	Log colif. tot. (UFC/mL)
1	330	61000	4,7853	33	350	4000	3,6021
2	330	55000	4,7404	34	350	2000	3,301
3	330	60000	4,7782	35	350	7700	3,8865
4	330	31000	4,4914	36	350	860	2,9345
5	330	43000	4,6335	37	350	8000	3,9031
6	330	660	2,8195	38	355	1700	3,2304
7	330	6200	3,7924	39	360	3500	3,5441
8	335	650	2,8129	40	360	5000	3,699
9	335	27000	4,4314	41	360	2200	3,3424
10	335	20000	4,301	42	360	2000	3,301
11	340	18000	4,2553	43	360	7000	3,8451
12	340	15000	4,1761	44	360	3800	3,5798
13	340	33000	4,5185	45	360	2000	3,301
14	340	30000	4,4771	46	360	1000	3
15	340	660	2,8195	47	360	1000	3
16	340	17000	4,2304	48	360	6000	3,7782
17	340	39000	4,5911	49	360	1500	3,1761
18	340	22000	4,3424	50	360	1300	3,1139
19	340	12000	4,0792	51	360	3000	3,4771
20	340	20000	4,301	52	360	8700	3,9395
21	340	3300	3,5185	53	360	870	2,9395
22	340	48000	4,6812	54	360	6900	3,8388
23	340	15000	4,1761	55	360	4800	3,6812
24	340	20000	4,301	56	365	280	2,4472
25	340	19000	4,2788	57	370	8000	3,9031
26	340	30000	4,4771	58	370	600	2,7782
27	340	33000	4,5185	59	370	300	2,4771
28	340	33000	4,5185	60	370	650	2,8129
29	345	4800	3,6812	61	370	650	2,8129
30	345	16000	4,2041	62	375	320	2,5051
31	345	16000	4,2041	63	375	600	2,7782
32	350	32000	4,5051	64	376	500	2,699

Tabela 3- Dados obtidos do tempo de redução (redutase, em minutos), microrganismos totais e logaritmo dos dados de microrganismos totais, em sistema **Petrifilm**.

Repetições	Redutase (min.)	Micr. tot. (UFC/mL)	Log Micr. tot. (UFC/mL)	Repetições	Redutase (min.)	Micr. tot. (UFC/mL)	Log micr. tot. (UFC/mL)
1	330	1100000	6,0414	33	350	96000	4,9823
2	330	830000	5,9191	34	350	65000	4,8129
3	330	970000	5,9868	35	350	72000	4,8573
4	330	880000	5,9445	36	350	38000	4,5798
5	330	730000	5,8633	37	350	10000	4
6	330	640000	5,8062	38	355	88000	4,9445
7	330	250000	5,3979	39	360	90000	4,9542
8	335	1200000	6,0792	40	360	60000	4,7782
9	335	250000	5,3979	41	360	30000	4,4771
10	335	200000	5,301	42	360	29000	4,4624
11	340	750000	5,8751	43	360	20000	4,301
12	340	260000	5,415	44	360	40000	4,6021
13	340	580000	5,7634	45	360	25000	4,3979
14	340	530000	5,7243	46	360	30000	4,4771
15	340	640000	5,8062	47	360	32000	4,5051
16	340	760000	5,8808	48	360	40000	4,6021
17	340	450000	5,6532	49	360	20000	4,301
18	340	300000	5,4771	50	360	24000	4,3802
19	340	410000	5,6128	51	360	19000	4,2788
20	340	470000	5,6721	52	360	25000	4,3979
21	340	410000	5,6128	53	360	25000	4,3979
22	340	280000	5,4472	54	360	22000	4,3424
23	340	330000	5,5185	55	360	22000	4,3424
24	340	440000	5,6435	56	365	2900	3,4624
25	340	250000	5,3979	57	370	16000	4,2041
26	340	200000	5,301	58	370	2700	3,4314
27	340	280000	5,4472	59	370	4000	3,6021
28	340	280000	5,4472	60	370	1100	3,0414
29	345	380000	5,5798	61	370	1100	3,0414
30	345	200000	5,301	62	375	1500	3,1761
31	345	170000	5,2304	63	375	3300	3,5185
32	350	310000	5,4914	64	376	1200	3,0792

Tabela 4- Dados obtidos do tempo de redução (redutase, em minutos), coliformes totais e logaritmo dos dados de coliformes totais, pelo sistema **Petrifilm**.

Repetições	Redutase (min.)	Colif. tot. (UFC/mL)	Log colif. tot. (UFC/mL)	Repetições	Redutase (min.)	Colif. tot. (UFC/mL)	Log colif. tot. (UFC/mL)
1	330	53000	4,7243	33	350	3100	3,4914
2	330	65000	4,8129	34	350	2000	3,301
3	330	76000	4,8808	35	350	8600	3,9345
4	330	30000	4,4771	36	350	800	2,9031
5	330	45000	4,6532	37	350	6000	3,7782
6	330	500	2,699	38	355	2300	3,3617
7	330	67000	4,8261	39	360	2700	3,4314
8	335	500	2,699	40	360	3000	3,4771
9	335	31000	4,4914	41	360	1000	3
10	335	18000	4,2553	42	360	1500	3,1761
11	340	30000	4,4771	43	360	4000	3,6021
12	340	11000	4,0414	44	360	3000	3,4771
13	340	36000	4,5563	45	360	1000	3
14	340	33000	4,5185	46	360	1000	3
15	340	500	2,699	47	360	2200	3,3424
16	340	13000	4,1139	48	360	4300	3,6335
17	340	40000	4,6021	49	360	1600	3,2041
18	340	18000	4,2553	50	360	1800	3,2553
19	340	12000	4,0792	51	360	3800	3,5798
20	340	22000	4,3424	52	360	710	2,8513
21	340	4200	3,6232	53	360	710	2,8513
22	340	36000	4,5563	54	360	8000	3,9031
23	340	10000	4	55	360	3600	3,5563
24	340	16000	4,2041	56	365	180	2,2553
25	340	22000	4,3424	57	370	700	2,8451
26	340	27000	4,4314	58	370	300	2,4771
27	340	23000	4,3617	59	370	100	2
28	340	23000	4,3617	60	370	550	2,7404
29	345	6000	3,7782	61	370	550	2,7404
30	345	18000	4,2553	62	375	200	2,301
31	345	14000	4,1461	63	375	700	2,8451
32	350	12000	4,0792	64	376	700	2,8451