ESTUDO DA MICROFLORA DE DERIVADOS DO LEITE COMO ÍNDICE DE QUALIDADE

CLAUDIO ROSA GALLO

Orientador: Dr. Antonio J. de Oliveira

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro, 1978

Aos meus pais, irmãos

e à Cristina

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e ao Departamento de Tecnologia Rural, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pelos recursos que ofereceram, sem os quais não seria possível a realização do presente trabalho.

Ao Professor Dr. Antonio Joaquim de Oliveira, pela valiosa colaboração, estímulo e compreensão como orientador.

Ao Professor Dr. João Gustavo Brasil Caruso, pelas sugestões apresentadas.

Aos Funcionários do Departamento de Tecnologia Rural, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos valiosos auxílios prestados.

Ao Sr. Paulo José de Gáspari, pelos serviços de datilografia, impressão e encadernação.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Página

1 - RESUMO 1

2 - INTRODUÇÃO 6

3 - REVISÃO DE LITERATURA 10

3.1 - Contagem Total 10

3.2 - Coliformes 12

3.3 - *Staphylococcus* 15

3.4 - *Salmonella* 21

3.5 - Bactérias Proteolíticas 25

3.6 - Bactérias Lipolíticas 27

3.7 - Bactérias Psicrotróficas 30

3.8 - Bactérias Termófilas 34

3.9 - Enterococos 35

3.10 - Fungos e Leveduras 36

4 - MATERIAL E MÉTODOS 39

4.1 - Contagem Total 40

4.2 - Coliformes 40

4.3 - *Staphylococcus* 41

4.4 - *Salmonella* 42

4.5 - Proteolíticos 43

4.6 - Lipolíticos 43

Página

4.7 - Psicrotróficos 43

4.8 - Termófilos 44

4.9 - Enterococos 44

4.10 - Fungos e Leveduras 44

4.11 - Esporulados Aeróbicos 45

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 46

5.1 - Queijos 46

5.2 - Leite em Pó 56

5.3 - Manteigas 61

6 - CONCLUSÕES 72

7 - SUMMARY 75

8 - LITERATURA CITADA 79

1 - RESUMO

Este trabalho foi realizado para se constatar a presença de microrganismos patogênicos e deterioradores em alguns derivados do leite, tais como: queijos (Prato , Minas Frescal e Provolone) , manteigas (com e sem sal) e leite em pó (integral e desnatado). Amostras comerciais foram tomadas e analisadas para: Contagem Total , Coliformes Totais , Coliformes Fecais , *Staphylococcus* , Psicrotróficos , Termófilos , Proteolíticos , Lipolíticos , Enterococos , *Salmonella* , Fungos e Leveduras.

O isolamento desses organismos seguiu as especificações descritas por SHARF (1972). A identificação foi feita de acordo com Standard Methods for the Examination of Dairy Pro-

ducts (A.P.H.A., 1972) , Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BUCHANAN e GIBBSONS, 1975) e Laboratory Exercices for Food Microbiology (BANWART, 1975).

As seguintes variações de contaminação por grama foram encontradas para queijos Prato , Minas Frescal e Provolone, respectivamente: Contagem Total: $8,0 \times 10^6$ à $2,3 \times 10^7$, $1,6 \times 10^8$ à $2,2 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^7$ à $2,0 \times 10^7$; Coliformes Totais: $6,3 \times 10^2$ à $2,0 \times 10^3$, $8,5 \times 10^4$ à $1,7 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^2$ à $8,8 \times 10^2$; *Escherichia coli:* $4,0 \times 10^2$ à $1,1 \times 10^3$, $2,9 \times 10^4$ à $1,6 \times 10^5$ e nenhuma amostra de queijo tipo Provolone mostrou a presença desse microrganismo ; Coliformes Fecais: $4,0 \times 10^2$ à $1,2 \times 10^3$, $4,0 \times 10^4$ à $1,6 \times 10^5$ e nenhum coliforme fecal foi detectado nas amostras de queijo tipo Provolone ; *Staphylococcus:* $1,1 \times 10^5$ à $2,3 \times 10^5$, $1,7 \times 10^6$ à $1,9 \times 10^6$ e $7,3 \times 10^5$ à $1,2 \times 10^6$; *S. aureus:* $2,9 \times 10^4$ à $4,4 \times 10^4$, $3,3 \times 10^5$ à $3,7 \times 10^5$ e $1,2 \times 10^4$ à $2,3 \times 10^4$; Termófilos: $1,0 \times 10^1$ à $1,7 \times 10^2$, ausência nas amostras de queijo tipo Minas Frescal analisadas e $7,2 \times 10^2$ à $9,9 \times 10^2$, para as amostras de queijo tipo Provolone ; Psicrotróficos (7ºC / 10 dias) ; nenhum à $1,3 \times 10^2$, $2,5 \times 10^2$ à $7,9 \times 10^2$ e ausência nas amostras de queijo tipo Provolone analisadas ; Psicrotróficos (21ºC / 25 horas): nenhum a $1,5 \times 10^2$, $2,0 \times 10^2$ à $8,0 \times 10^2$ e ausência nas amostras de queijo tipo Provolone analisadas ; Proteolíticos: $2,6 \times 10^2$ à $6,4 \times 10^2$, $4,0 \times 10^4$ à $7,8 \times 10^4$ e $2,0 \times 10^4$ à $1,2 \times 10^5$; Lipolíticos:

$1,0 \times 10^3$ à $1,7 \times 10^3$, $2,7 \times 10^4$ à $9,1 \times 10^4$ e $2,3 \times 10^4$ à $2,4 \times 10^4$; Enterococos: $1,2 \times 10^4$ à $2,5 \times 10^4$, $1,3 \times 10^5$ à $2,8 \times 10^5$ e $2,9 \times 10^4$ à $7,7 \times 10^5$; Fungos e Leveduras: $1,5 \times 10^4$ à $1,6 \times 10^5$, $2,4 \times 10^3$ à $7,0 \times 10^3$ e $5,1 \times 10^4$ à $5,4 \times 10^4$; *Salmonella*: uma amostra de queijo tipo Prato e uma de queijo tipo Minas Frescal foram positivas para esse organismo e todas as amostras de queijo tipo Provolone foram negativas.

As contagens por grama para as amostras de manteigas com sal e sem sal, foram respectivamente: Contagem Total: $1,1 \times 10^6$ à $1,5 \times 10^6$ e $1,8 \times 10^6$ à $2,5 \times 10^6$; Coliformes Totais: $1,0 \times 10^4$ à $1,8 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$ à $2,8 \times 10^4$; *E. coli*: ausência nas amostras de manteiga com sal e nenhum à $6,0 \times 10^2$ nas amostras de manteiga sem sal ; Coliformes Fecais: nenhum coliforme fecal foi detectado nas amostras de manteiga com sal e nenhum à $6,0 \times 10^2$ nas amostras sem sal ; *Staphylococcus*: $1,6 \times 10^4$ à $1,8 \times 10^4$ e $8,6 \times 10^3$ à $9,9 \times 10^3$; *S. aureus*: nenhum à $3,2 \times 10^3$ e $8,0 \times 10^2$ à $1,8 \times 10^3$; Termófilos: $1,3 \times 10^2$ à $2,0 \times 10^2$ e $3,1 \times 10^2$ à $4,4 \times 10^2$; Psicrotróficos (7ºC / 10 dias): $7,3 \times 10^2$ à $8,1 \times 10^2$ e $1,3 \times 10^4$ à $1,7 \times 10^4$; Psicrotróficos (21ºC / 25 horas): $6,8 \times 10^2$ à $8,1 \times 10^2$ e $1,1 \times 10^4$ à $1,5 \times 10^4$; Proteolíticos: $1,6 \times 10^4$ à $2,0 \times 10^4$ e $1,1 \times 10^5$ à $1,2 \times 10^5$; Lipolíticos: $1,0 \times 10^3$ à $1,1 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^3$ à $1,7 \times 10^3$; Enterococos: $7,0 \times 10^1$ à $1,3 \times 10^2$ e $2,7 \times 10^2$ à $5,6 \times 10^2$; Fungos e Leveduras: $9,8 \times 10^3$ à $1,0 \times 10^4$ e $9,7 \times 10^3$ à $1,4 \times 10^4$; *Salmonella*: foi detectada em

uma amostra de manteiga com sal e em uma amostra de manteiga sem sal.

Para as amostras de leite em pó integral e leite em pó desnatado, as contagens foram respectivamente: Contagem Total: $9,2 \times 10^5$ à $1,1 \times 10^6$ e $3,2 \times 10^5$ à $8,6 \times 10^5$; nem coliformes e nem *Staphylococcus* foram detectados nas amostras de leite em pó analisadas ; Termófilos: $3,2 \times 10^2$ à $6,1 \times 10^2$ e $5,0 \times 10^1$ à $1,1 \times 10^2$; Psicrotróficos (7ºC / 10 dias e 21ºC/ 25 horas) e Enterococos: não foram encontrados nas amostras analisadas ; Proteolíticos: $1,6 \times 10^3$ à $1,9 \times 10^3$ e $9,5 \times 10^2$ à $1,3 \times 10^3$; Lipolíticos: $6,0 \times 10^1$ à $2,3 \times 10^2$ e $5,0 \times 10^1$ à $1,6 \times 10^2$; Fungos e Leveduras: $1,5 \times 10^2$ à $6,7 \times 10^2$ e nenum à $4,2 \times 10^1$; Esporulados Aeróbicos: $5,0 \times 10^2$ à $6,3 \times 10^2$ e $5,5 \times 10^1$ à $1,7 \times 10^2$; *Salmonella:* todas as amostras foram negativas para esse microrganismo.

As altas contagens verificadas para Contagem Total , Coliformes Totais , Coliformes Fecais , *S. aureus* , Enterococos , Proteolíticos , Lipolíticos e Psicrotróficos na maioria das amostras de derivados do leite analisadas nesse trabalho, e a presença de *Salmonella* em algumas delas, revelam que as mesmas devem ser consideradas impróprias ao consumo humano, uma vez que, a maioria das contagens de microrganismos patogênicos, está acima dos padrões estabelecidos pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.

Por outro lado, essas altas contagens microbianas , podem ser indicadoras de más condições higiênicas: nas indústrias de laticínios, no transporte e na distribuição desses produtos.

2 - INTRODUÇÃO

O leite e seus diversos derivados, têm importância primordial em nossa alimentação diária. Esses alimentos nos fornecem uma alta soma de carboidratos, gorduras, proteínas, minerais e vitaminas, e, como consequência de sua excelente composição, aliada ao fato de ter um pH favorável ao crescimento de microrganismos e bastante umidade disponível, constituem-se também em substrato ótimo para um grande número de microrganismos, principalmente as bactérias.

Muitas das bactérias encontradas comumente no leite e seus derivados são de pequena importância em relação à qualidade do produto. Outras porém são agentes de deterioração, de

vendo obviamente serem evitadas ou destruídas. Outras ainda são de natureza patogênica e logicamente são as mais importantes no que concerne à saúde pública.

Assim, a indústria de laticínios nos dá um excelente exemplo de um campo onde os microrganismos (bactérias, leveduras e fungos), são de grande importância tanto do ponto de vista tecnológico como da conservação e qualidade dos produtos finais. Nesta indústria, a destruição de microrganismos indesejáveis, bem como a utilização dos que são desejáveis, exigem muita atenção.

Os microrganismos e seus metabólitos são indesejáveis no leite e seus derivados, quando capazes de provocar alterações no sabor e aroma e/ou características físicas, ou quando capazes de causar distúrbios de ordem fisiológica ao homem, ou seja, quando se constituem em microrganismos patogênicos.

A presença de microrganismos indesejáveis no leite e seus derivados, geralmente é devida à:

a) Más condições de higiene na obtenção do leite;
b) Pasteurização e esterilização inadequadas;
c) Falta de cuidados higiênicos durante o processamento;
d) Má higienização e assepsia dos equipamentos;
e) Más condições de armazenamento e tipo de embalagem, já que nessa fase pode ocorrer recontaminação do produto, ou condições favoráveis ao crescimento de microrganismos.

A temperatura se constitui num fator extremamente útil no controle de microrganismos. Baseado nos ótimos, máximos e mínimos de temperatura, para cada microrganismo, sua destruição pode ser conseguida por aplicação de temperaturas que ultrapassem o seu máximo ou mínimo, respectivamente. Como os organismos vivos compõem-se largamente de água, o limite mais baixo para o seu desenvolvimento é rigidamente estabelecido pela temperatura de congelamento da água. O limite superior é estabelecido pela instabilidade térmica dos constituintes químicos da matéria viva, ou seja, proteínas e ácidos nucléicos, substâncias essas rapidamente destruídas à temperaturas entre 50 e 90ºC (STANIER *et alii*, 1969).

Para cada organismo há uma curva de crescimento característica, na qual se observam temperaturas mínima, ótima e máxima para o crescimento. À temperaturas próximas do mínimo, todas as reações químicas da célula se processam lentamente e a taxa de crescimento é consequentemente baixa. Nessa região, um pequeno aumento de temperatura produz um enorme aumento na taxa de crescimento. À medida que se aproxima da temperatura ótima, o aumento na taxa de crescimento para um dado aumento de temperatura, torna-se cada vez menor (STANIER *et alii*, 1969). Por outro lado, um aumento de temperatura, acima do ótimo, produz um rápido declíneo na taxa de crescimento.

No processamento de derivados de leite, o calor e o frio são dois fatores extremamente importantes. O primeiro u-

sado para destruição dos possíveis contaminantes presentes e o segundo como agente de conservação, mantendo a velocidade das reações enzímicas, que possam ocorrer a níveis relativamente baixos, ou, como inibidor do crescimento de microrganismos,que possam ter sobrevivido ao tratamento térmico.

Embora as técnicas utilizadas no processamento, embalagem e distribuição do leite e seus derivados, estejam em constantes progressos, ainda são encontrados nos produtos finais, microrganismos patogênicos que podem trazer sérias infecções e intoxicações alimentares, bem como, microrganismos causadores de defeitos, que tornam o produto de baixa qualidade para o consumo.

O presente trabalho visou a caracterização desses microrganismos, procurando estabelecer, através dos níveis de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores do produto, uma relação entre a qualidade microbiológica do produto e as atuais condições de processamento e distribuição de alguns derivados do leite.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Contagem Total

ROGERS (1915), já indicava contagem total como um delicado critério de qualidade.

KILBOURNE (1920), enfatizou o perigo de se usar contagens totais como único meio para avaliar a qualidade de amostras de leite.

HOBBS e GILBERT (1974), colocam o método de contagem total como um importante método auxiliar na determinação da qualidade de um alimento, já que existe um perigo potencial de encontrarmos microrganismos patogênicos e/ou deteriorado -

res, quando altas contagens microbianas são observadas em alimentos.

Os primeiros trabalhos de comparação de incubação para contagens totais de bactérias em placas, para leite cru e produtos de leite, foram feitos por PEDERSON e YALE (1934), que indicaram que à 32ºC conseguem-se maiores e mais representativas contagens que à 37ºC , o que concorda com as recomendações da 13ª edição do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1972).

Investigações feitas por CROSSLEY e JOHNSON (1942) , mostraram que a microflora do leite em pó é influenciada pela população inicial do leite, tratamento térmico antes e durante a secagem, condições sanitárias dos equipamentos e contaminação após a secagem.

Um decréscimo no conteúdo microbiano normalmente ocorre durante armazenamentos prolongados do leite em pó, com a taxa de morte sendo influenciada pela umidade do produto, temperatura de armazenamento e tipo de organismos presentes (CROSSLEY e JOHNSON, 1942).

NAGUIB *et alii* (1972), identificaram os organismos predominantes isolados das contagens totais em placas, para leite em pó, como: Estreptococos , Micrococos , Microbactérias , *Sarcina* e Bacilos, formadores de esporos.

3.2 - Coliformes

Além de *Escherichia coli* que é proveniente do trato intestinal, frequentemente incluem-se os seguintes microrganismos entre os coliformes: *Klebsiella* , *Aerobacter* , *Salmonella* e *Shigella* (JAWETZ *et alii*, 1970). Segundo os mesmos autores, os organismos coliformes mostram-se patogênicos, somente, quando alcançam tecidos fora do trato intestinal, particularmente o trato urinário, o trato biliar, o peritônio ou as meninges, causando inflamação nestes locais.

ASHTON (1950), verificou que microrganismos do grupo coliforme podem se desenvolver à temperaturas de refrigeração, isto é, 4,5 - 10ºC . Segundo o mesmo autor, temperaturas de incubação de 22 e 30ºC parecem ser mais favoráveis ao desenvolvimento de coliformes em leite, enquanto que a 37ºC o crescimento é ligeiramente retardado.

Existem dois tipos de *E. coli* enteropatogênica capazes de causar desarranjos de origem alimentar: invasivos e enterotoxinogênicos (FRANK *et alii*, 1978). Dificuldades tem sido encontradas, tanto para se estimar a incidência de doenças produzidas por *E. coli* enteropatogênica, devido a dificuldade do diagnóstico da doença (SACK, 1975), como também para se detectar a presença desse microrganismo em alimentos, em razão dos problemas no isolamento dos organimos (MEHLMAN *et alii*, 1974) e na determinação da patogenicidade dos isolados

(MEHLMAN *et alii*, 1976).

O número de *E. coli* enteropatogênica necessário para causar doença, é de 10^6 à 10^8 células para os tipos invasivos e 10^8 à 10^9 células para os tipos enterotoxinogênicos (MEHLMAN *et alii*, 1976).

Infecções intestinais associadas com a presença de *E. coli* em alimentos tem recentemente se tornado problema de saúde pública (MARIER *et alii*, 1973 e MEHLMAN *et alii*, 1976), embora *E. coli* enteropatogênica tenha sido mais frequentemente associada com diarréias infantis em enfermarias (RYDER *et alii*, 1976).

A presença de *E. coli* enteropatogênica em alguns derivados do leite, pode ser um problema importante de saúde pública, como evidenciado por um surto em 1971 de gastroenteritis associadas com queijo camembert (MARIER *et alii*, 1973).

E. coli enteropatogênica tem capacidade de crescer durante a elaboração de queijos moles e semi-moles e de permanecer no produto maturado (FRANK *et alii*, 1977 e FRANK *et alii*, 1978), assim como crescer no produto maturado à temperaturas de refrigeração (FANTASIA *et alii*, 1975).

FRANK *et alii* (1977), correlacionaram a presença de coliformes fecais em alimentos com a ocorrência de *E. coli* enteropatogênica, o que foi demonstrado no trabalho de FRANK e MARTH (1978).

A presença de coliformes em queijos, normalmente significa práticas de elaboração inadequadas sob o ponto de vista sanitário (YALE, 1943 e ERNSTROM, 1954), embora a ocorrência de coliformes fecais em produtos de leite pasteurizado seja sazonal, com maiores números aparecendo nos meses de verão (JONES *et alii*, 1967).

A detecção de bactérias coliformes na manteiga é importante como controle bacteriológico, tanto do ponto de vista higiênico, como da conservação do produto, uma vez que esses microrganismos podem causar deteriorações no sabor e aroma da manteiga. THOMSON (1950), relacionou a presença de *A. aerogenes* com o aparecimento de cheiro de estábulo no produto. O mesmo autor estabeleceu que organismos coliformes podem ser indicadores das condições de processamento e sua presença na manteiga significa que falhas estão ocorrendo em algum estágio. Ainda segundo THOMSON (1950), para a completa destruição de tais microrganismos a temperatura de pasteurização do creme deve ser superior a 85ºC . Desta forma, provado que a pasteurização é efetiva, a presença de coliformes é usualmente devido à falta de limpeza dos equipamentos, ou recontaminação por falhas no manuseio do produto (THOMSON, 1950).

3.3 - *Staphylococcus*

Esses microrganismos produzem enterotoxinas classificadas nos seguintes tipos: A , B , C , D , E e F (BERGDOLL , 1969). Podem ser causadores de náuseas , salivação , vômitos , diarréias , cólicas abdominais , desidratação, prostração e excessiva transpiração. Febre normalmente não ocorre. Estes sintomas tem pequena duração (não mais que 1 - 2 dias) , (BRYAN , 1973).

As principais fontes de tais microrganismos são: descargas nasais e da garganta, mãos e pele, cortes infeccionados, ferimentos, fezes, etc... e assim chegam aos alimentos por falta de cuidados higiênicos no manuseio (BRYAN, 1973).

Os *Staphylococcus* patogênicos são geralmente hemolíticos e coagulam o plasma sanguíneo. Alguns representantes deste gênero fazem parte da flora normal da pele e mucosas do homem, enquanto outros provocam supurações, formação de abcessos, várias infecções piogênicas e, muitas vezes, septicemias fatais (JAWETZ *et alii*, 1970).

O tipo mais frequente de intoxicação alimentar é causado pelas enterotoxinas termoestáveis produzidas por certas espécies de *Staphylococcus*. As enterotoxinas são frequentemente produzidas quando tais microrganismos crescem em alimentos ricos em carboidratos (JAWETZ *et alii*, 1970).

A maioria dos *Staphylococcus* patogênicos ao homem produz coagulase, uma substância (proteína) que age como enzima capaz de coagular o plasma oxalatado ou citratado, em presença de um fator que existe na maioria dos soros sanguíneos. Este fator sérico reage com a coagulase, para provocar o aparecimento da atividade da esterase e ação coagulante, de uma maneira similar à ativação de pró-trombina para trombina (JAWETZ *et alii*, 1970).

A habilidade de *Staphylococcus* coagulase negativos produzirem enterotoxina não foi ainda determinada. Entretanto, baseado em alguns estudos (MINOR e MARTH, 1972 ; RAYMAN *et alii*, 1975 e SPERBER e TATINI, 1975), pode-se esperar que alguns *Staphylococcus* coagulase negativos produzam toxina.

Segundo TROLLER (1976), os ótimos de temperatura para produção de toxina e crescimento estão entre 35 e 39ºC. A temperatura mínima para o crescimento é 7ºC e a máxima 48ºC. A produção de enterotoxina ocorre entre 10 e 45ºC.

Embora ocorram variações nos diferentes "strains", o pH mínimo para o crescimento de *Staphylococcus* é 4,6 - 4,7 , dependendo do ácido usado para ajustar o pH (MINOR e MARTH, 1972).

O valor máximo de pH para o crescimento é, provavelmente, 9,5 - 9,8 , embora a produção de enterotoxina normalmente não ocorra com pH superior a 9,0 e se reduz para 50% à pH igual a 8,0. À pH 5,0 ou menos, pouca ou nenhuma toxina é produzida. O pH ótimo para produção de enterotoxinas B e C é 6,8 , enquan

to que a síntese de enterotoxina A ocorre em maior proporção com pH entre 5,3 e 6,8 (TROLLER, 1976).

Vários casos de intoxicações alimentares, provenientes da ingestão de queijos contaminados com *Staphylococcus* , foram relatados na literatura por HENDRICKS *et alii* (1959).

MARKUS e SILVERMAN (1968), demonstraram que as enterotoxinas são produzidas na última parte da fase exponencial de crescimento, o que concorda com os trabalhos de MORSE *et alii* (1969), que mostraram que a produção de enterotoxinas, ocorre entre a fase exponencial e a fase estacionária.

Embora a intoxicação causada por este organismo se caracterize por baixíssima mortalidade e período relativamente curto de duração, a frequência dos casos e a severidade dos sintomas, fazem da intoxicação estafilocócica, uma importante doença em muitos tipos de alimentos (TROLLER, 1976).

Até alguns anos atrás, creme e manteiga, particularmente o último, não eram considerados veículos de enterotoxina estafilocócica. A Foodborne Surveillance Unit of the National Center for Disease Control (1970), não havia mencionado nenhum caso de intoxicação alimentar por *S. aureus* em manteiga até 1970 , quando 24 pessoas foram atingidas.

Segundo MINOR e MARTH (1972), o creme usado para fabricação da manteiga pode suportar crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxina A , se for estocado à temperaturas elevadas ou deixado por longos períodos à baixas temperaturas.

Provavelmente o crescimento de *Staphylococcus* é maior quando a manteiga contém menos que 1,5% de sal. Tal organismo pode sobreviver na manteiga com mais que 1,5% de sal, mas a sobrevivência é acentuadamente menor à baixas temperaturas (MINOR e MARTH, 1972).

BERGDOLL (1970), acredita que menos que um micrograma de enterotoxina A , pode provocar sintomas de intoxicação estafilocócica alimentar no ser humano.

Grande número de células vegetativas e mesmo enterotoxinas, podem ser transferidas aos alimentos no manuseio ou pelas superfícies dos equipamentos.

Aquecimento é, provavelmente, a técnica mais comumente usada para destruir *Staphylococcus* e para inativação ou redução da potência da toxina. O valor Z (número de graus necessários para provocar uma mudança de dez vezes no valor D) , oscila entre 5 e 6ºC e os valores D 60 (tempo à 60ºC requerido para produzir uma redução de 90% na contagem das células) são usualmente de 3 a 5 minutos (TROLLER, 1976).

De acordo com os resultados de HEINEMANN (1957), o tempo de destruição térmica de *Staphylococcus* no leite é de 1,9 minutos à 65ºC .

Staphylococcus são também susceptíveis aos efeitos bactericidas dos compostos quaternários de amônia. Esta é a razão de aplicações desses agentes sanificantes em equipamentos utilizados no processamento de alimentos (TROLLER, 1976).

Um dos aspectos relativos ao crescimento de *Staphylococcus* é sua habilidade de crescer em baixos níveis de atividade de água (aw) . A aw mínima para crescimento nos meios utilizados em laboratório é aproxidamente 0,86 (SCOTT, 1953 e TROLLER, 1976).

Outro fator limitante de crescimento é a inibição por outros organismos. De uma maneira geral, *S. aureus* , não é um bom competidor e assim é facilmente suprimido por outros organismos nos alimentos. As razões desse efeito competitivo podem ser resultado da produção de substâncias inibidoras, competição por nutrientes e alteração em vários fatores de crescimento, levando-os a níveis desfavoráveis (TROLLER, 1976). Segundo o mesmo autor, microbiologistas em laticínios há muito tem concluído que culturas iniciadoras são essenciais para prevenir o crescimento de *S. aureus* durante a elaboração de queijos. Bactérias láticas são as mais importantes iniciadoras que suprimem o crescimento de *S. aureus* , na fabricação de queijos.

DONNELLY *et alii* (1968), observaram que *Staphylococcus* crescem muito pouco em leite cru com altas contagens bacterianas, mas prosperam e produzem enterotoxina em leite pasteurizado.

A natureza da atmosfera pode também controlar o crescimento e a produção de enterotoxina. *Staphylococcus* crescem bem nos meios usados em laboratório, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas, entretanto, a produção de toxina normalmente é

reduzida em condições anaeróbicas. Em alimentos, uma situação parecida acontece: crescimento e formação de toxina podem ocorrer sob condições anaeróbicas, mas se processam melhor na presença de oxigênio.

As contagens de *S. aureus* para produção de enterotoxina devem ser bastante altas: 10^7 - 10^8 células por grama de alimento (TROLLER, 1976).

Outros fatores que controlam crescimento e produção de toxina são: complementos nutricionais do meio, pH , temperatura, tamanho e tipo do inóculo e o efeito de organismos competidores.

Na indústria de queijos, um rápido tratamento térmico, à 65ºC , destrói todos os *Staphylococcus* naturalmente presentes no leite. Portanto, leite e seus derivados, desde que adequadamente tratados termicamente, devem ser livres de um número significante desses microrganismos (HEINEMANN, 1957). Assim, o perigo de intoxicação associado com a presença de *Staphylococcus* em queijos, pode ser considerado reduzido, pelo uso de tratamento térmico do leite para elaboração de queijos. Uma estreita correlação tem sido observada entre a contagem total inicial do leite e a extensão da multiplicação de *Staphylococcus*. Isso está de acordo com as descobertas de GIBSON e MALLECK (1957), que mostraram que *Staphylococcus* à baixas temperaturas (10 - 20ºC), podem crescer ativamente, somente quando a contagem total de bactérias for baixa.

TAKAHASHI e JOHNS (1959), sugeriram que uma pronta refrigeração do leite após a ordenha e tratamento térmico antes da elaboração do queijo, diminuem o risco de saúde pública, associado com a presença de *Staphylococcus* em queijos. Esses autores mostraram também que o soro do leite contém muito pouco *Staplylococcus* , sugerindo que a maioria deles fica presa no coágulo. A contagem de *Staphylococcus* em queijos decresce gradualmente durante a cura e o armazenamento. Ainda no trabalho de TAKAHASHI e JOHNS (1959), ficou evidenciado que nas épocas quentes, contagens mais elevadas são obtidas.

Um total controle da contaminação de alimentos por *Staphylococcus* pode ser difícil de se conseguir, porém, uma sanificação efetiva das superfícies dos equipamentos e aceitáveis práticas higiênicas como: frequente e correta lavagem das mãos, remoção de pessoas com doenças respiratórias das áreas de contato com o produto, podem aliviar este problema (TROLLER, 1976).

3.4 - *Salmonella*

As Salmonellas podem produzir três tipos de doenças , embora sejam frequentes as formas mistas:

A - Febres intestinais: tifóide (*S. typhi*) e paratifóide (*S. paratyphi*). As lesões mais destacadas são hiperplasia e necrose do tecido linfóide (por exemplo nas Placas de Peyer), ne-

crose focal do fígado, inflamação da vesícula biliar e ocasionalmente de outros locais, como periósteo e pulmões.

B - Septicemias.

C - Gastrenteritis (denominadas frequentemente de intoxicações alimentares.

Ainda podem causar diarréia, dores abdominais, vômitos, desidratação,prostração e anorexia. A duração de tais sintomas é de vários dias.

O gênero *Salmonella* , enquadrado na família *Enterobacteriaceae* , é composto por mais de 1.400 serotipos. Todas as espécies são potencialmente patogênicas para o homem, animais ou para ambos (EDWARDS e GALTON, 1967).

Embora a recuperação seja normalmente rápida, algumas complicações podem aparecer em crianças, pessoas idosas e pessoas nas quais a infecção se espalhe no intestino para outras partes do corpo, resultando em sérios problemas e mesmo em morte (FAGERBERG e AVENS, 1976). Segundo os mesmos autores, Salmonellas são bem distribuídas e aparecem em grande variedade de alimentos e em ingredientes de alimentos, causando um grande problema na indústria alimentícia.

Alimentos contendo *Salmonella* não devem ser vendidos, pois, de acordo com House Committee on Interstate and Foreign Commerce and the Senate Committee on Labor and Public Welfare (1973), são adulterados por conterem microrganismos danosos ou

patogênicos.

As fontes contaminantes de alimentos envolvidas se constituem principalmente de fezes de animais domésticos,ou não, e do próprio homem. Além do leite, outros alimentos, como: ovos, carnes, etc., podem conter tais microrganismos (BRYAN , 1973).

GOEPFERT *et alii* (1968), encontraram que para uma diminuição significativa no número de *Salmonella* em queijo cheddar, um período de 10 a 12 semanas à 13ºC deve ser verificado ou de 14 a 16 semanas à 7,5ºC e, no entanto, muitos queijos são consumidos depois de curtos períodos de maturação (às vezes somente dias), o que pode se constituir numa fonte de contaminação por *Salmonella*. Por outro lado, desde que esses produtos sejam fabricados com leite adequadamente pasteurizado, a presença de *Salmonella* indica contaminação por fontes externas, ou seja, recontaminação (KEOGH, 1971).

Numerosas técnicas para isolamento de *Salmonella* tem sido propostas para alimentos, mas nenhum método em particular mostrou ser melhor que todos os outros. A maioria dos métodos envolve pré-enriquecimento, enriquecimento, plaqueamento seletivo, testes bioquímicos e serológicos. O enriquecimento estimula o crescimento e a multiplicação de *Salmonella* , enquanto que outros organismos gram negativos, como: Coliformes , *Proteus* , *Pseudomonas* , são suprimidos ou inibidos (FAGERBERG e AVENS , 1976).

Métodos para isolamento de *Salmonella* foram primeiramente desenvolvidos para espécimes clínicos, devido à larga distribuição das doenças animais e humanas (GALTON *et alii*, 1968).

Mais tarde, quando alimentos tornaram-se evidentes como um importante fator nas principais infecções por *Salmonella* tentou-se o desenvolvimento de métodos que fossem satisfatórios tanto para amostras clínicas como alimentícias. Foi encontrado que estes métodos não eram sempre efetivos na detecção de *Salmonella* em alimentos e, de fato, alguns dos meios eram tóxicos aos organismos (HARGROVE *et alii*, 1971).

Nenhum procedimento ideal foi ainda recomendado para isolamento de todos os serotipos de *Salmonella* em todos os tipos de alimentos. Muitas variáveis tem sido estudadas nas análises de *Salmonella* ; algumas são controláveis, outras não. Essas variáveis incluem: tipo de enriquecimento, número de competidores, serotipos de *Salmonella* , tipo de amostra e tempo e temperatura de incubação (FAGERBERG e AVENS, 1976).

Atualmente as modificações introduzidas para os meios de enriquecimento propostas pelo Food and Drug Administration's (FDA's) Bacteriological Analytical Manual (1972), pela National Academy of Sciences (1971) e pela Association of Official Analytical Chemists (1970), são as mais recomendadas para o isolamento de *Salmonella* em alimentos.

3.5 - Bactérias Proteolíticas

A hidrólise das proteínas do leite por microrganismos é acompanhada pela produção de um sabor amargo devido a formação de polipeptídeos. Essa proteólise é favorecida por armazenamento à baixas temperaturas; pela destruição das bactérias láticas e outros produtores de ácido, pelo calor. A proteólise da caseína no leite e seus derivados por certas bactérias, como: *Pseudomonas* , *Flavobacterium* e *Alcaligenes*, frequentemente resulta na obtenção de um produto com sabor e aroma alterados (FOSTER *et alii*, 1957 ; MICKELSON *et alii*, 1967 ; CHUNG e CANNON, 1971 e MORENO e KOSIKOWSKI, 1973).

Bactérias psicrotróficas são dificilmente excluídas do leite cru e assim podem crescer e produzir enzimas proteolíticas durante armazenamento em refrigeração do mesmo (ADAMS *et alii* , 1975).

Desenvolvimento de sabor amargo e coagulação ou gelatinização no leite esterilizado é comum e pode ser causada por proteases termo-resistentes (SAMUELSSON e HOLM, 1966). Segundo ADAMS *et alii* (1975), a maioria das amostras de leite cru parece conter proteases termo-resistentes ou bactérias capazes de produzí-las e, aparentemente, grandes populações de psicrotróficos não são requeridas para a produção de significante protease termo-resistente.

A resistência das proteases produzidas por organismos psicrotróficos, sugere que sua destruição pelo calor é impraticá

vel. Um tratamento térmico capaz de destruir uma significante taxa de protease, pode ser muito prejudicial às características organoléticas do leite (ADAMS *et alii*, 1975). Ainda segundo ADAMS *et alii* (1975), a concentração de caseína e pH do leite, parecem ser ótimos para a atividade da protease e embora o ótimo de temperatura seja 45ºC , a protease se mostra bastante ativa à temperatura ambiente (25ºC). De acordo com os mesmos autores proteases termo-resistentes produzidas no leite cru, podem levar à deterioração de outros produtos do leite e afetar a qualidade de alimentos elaborados com leite e seus derivados.

Inativação de proteases termo-resistentes pelo uso de baixas temperaturas pode ser aplicada antes ou depois da esterilização. O tratamento realizado com melhores resultados foi 55ºC por uma hora ou menos. Tratamentos com tempo superior à uma hora podem continuar destruindo protease numa taxa baixa , mas alterações das proteínas do soro podem ocorrer (HARLAND *et alii* , 1952).

VAN der ZANT e NELSON (1953), encontraram que uma enzima endocelular de *Streptococcus lactis* causa diferentes graus de proteólise da alfa, beta e gama caseína à diferentes valores de pH , enquanto que POZNANSKY *et alii* (1965), encontraram enzimas intercelulares de *Micrococcus caseolyticum* degradando com eficiência a alfa caseína.

PURSCHEL e POLLACK (1972), mostraram que a maioria das bactérias psicrotróficas atacam beta caseína preferencial -

mente à alfa caseína, enquanto que KIURU *et alii* (1971) e YANAGIYA *et alii* (1973), mostraram que enzimas proteolíticas produzidas por *Pseudomonas* e *Flavobacterium spp* , degradam igualmente alfa e beta caseína.

MAYERHOFER *et alii* (1973), mostraram que *P. fluorescens* P 26 , produz uma protease que requer 120ºC por nove minutos para perda de 90% de sua atividade.

3.6 - Bactérias Lipolíticas

Espécies de bactérias formadoras de lipase são encontradas em muitos gêneros, como por exemplo: *Pseudomonas* , *Achromobacter* , *Alcaligenes* , *Micrococcus* e outros (OVERCAST e SKEAN, 1959).

As bactérias lipolíticas na sua maior parte são aeróbicas ou facultativas, proteolíticas e não produtoras de ácido. A ação dessas bactérias é particularmente importante em cremes, manteigas e queijos, durante períodos extensos de refrigeração. Bactérias lipolíticas frequentemente são psicrotróficas e isso pode se constituir num duplo problema em relação aos defeitos que causam nos produtos acima citados.

ANDERSON e HARDENBERGH (1932), estudaram a deterioração de cremes e manteiga refrigerados, pelo organismo *Achromobacter*. Durante a deterioração, a única mudança bioquímica foi a hidrólise da gordura, o que acarretou o desenvolvimento de

sabor e aroma amargos.

HAMMER e COLLINS (1934), encontraram que creme cru sem sal não pasteurizado, deixado sete dias à 6ºC , frequentemente desenvolve rancidez e contém grande número de bactérias lipolíticas.

THOMAS (1958), concluiu que *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi*, ambos conhecidos como microrganismos que crescem bem à 5ºC , podem ser os organismos mais comuns responsáveis pela rancidez que ocorre na manteiga.

DAVIS (1951), acreditava que o gosto amargo produzido no leite deixado à baixa temperatura, era de preferência resultado da degradação da gordura, do que à formação de peptonas.

Pelos resultados obtidos no trabalho de OVERCAST e SKEAN (1959), nota-se que culturas que crescem bem no leite à 4 ± 1ºC , como *Pseudomonas* , aumentam a quantidade de ácidos graxos livres no leite. Tal aumento, é atribuído somente à ação lipolítica dos microrganismos, já que não ocorreu similar aumento nas amostras controles, ou nas amostras com pouco crescimento. Rancidez e sabor amargo, são defeitos predominantemente desenvolvidos em amostras de leite onde ocorre grande crescimento de organismos lipolíticos (OVERCAST e SKEAN, 1959).

De acordo com MOUREY e KILBERTUS (1976), embora verdadeira a atividade da lipase, ela é às vezes, confundida com a atividade da esterase, porém pode ser detectada realmente pelo uso de tributirina como substrato, pois para bactérias há boa cor

relação entre a atividade da tributirinase e o poder lipolítico.

SHAHANI (1974), relacionou alguns tipos de lipases microbianas, com espécies de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* , *Achromobacter* e *Staphylococcus*, e uma alta incidência de atividade lipolítica, entre as bactérias psicrotróficas, gram negativas, em leite cru, foi encontrada por LAW *et alii* (1976) , em strains de *Pseudomonas fluorescens* e *P. fragi* , sendo que as lipases produzidas por todos os strains lipolíticos permaneceram ativas ou parcialmente ativas depois de aquecimento à 63ºC por 30 minutos.

PINHEIRO *et alii* (1965), mostraram que lipases extracelulares de bactérias psicrotróficas no leite cru (*Pseudomonas* e *Alcaligenes spp*) são resistentes à pasteurização, embora esta mate as células vegetativas. Tais enzimas subsequentemente causam excessiva lipólise e rancidez no creme, na manteiga e nos queijos.

Alguns produtos de leite, como: cremes pasteurizados, creme para elaboração de manteiga, leite em pó integral, etc. estão sujeitos à vários tratamentos térmicos abaixo de 100ºC e assim, são susceptíveis à deterioração pela ação de lipases no armazenamento (LAW *et alii*, 1976).

O trabalho de NASHIF e NELSON (1953), mostrou que a lipase produzida por *P. fragi* requer vinte minutos à 99ºC para sua completa destruição.

Queijos feitos de leites nos quais bastonetes, gram negativos, lipolíticos, tenham se multiplicado atingindo 10^7 colô-

nias por ml, tornam-se rançosos depois de quatro meses, mesmo que os organismos tenham sido mortos pela pasteurização. A rancidez se caracteriza por um gosto amargo e aroma de sabão em queijos que apresentam concentrações de ácidos graxos livres, 3 a 10 vezes maiores que nos elaborados de leites com baixas contagens de bastonetes, gram negativos, lipolíticos (LAW *et alii*, 1976). De acordo com os mesmos autores, desde que altas contagens de psicrotróficos no leite cru são requeridas para produzir rancidez em queijos, contagens menores que 10^6 por ml tem pequena influência no sabor e aroma do queijo cheddar, desenvolvidos até que o mesmo esteja maturado (14 meses). É, no entanto, importante lembrar que como o defeito em queijos é causado por lipases extracelulares, não importa que as contagens sejam baixas, se suficiente lipase estiver presente.

Segundo FRANKLIN e SHARPE (1963), a temperatura de armazenamento e condições do próprio queijo, tais como: pH e teor salino, afetam a multiplicação e atividade metabólica das bactérias lipolíticas, assim como o desenvolvimento do ranço, já que a hidrólise da gordura é acentuadamente aumentada com o aumento do pH e da temperatura.

3.7 - Bactérias Psicrotróficas

O termo psicrotrófico é usado na 13ª edição do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A. ,

1972), para indicar os microrganismos que são capazes de formar colônias visíveis em nutriente agar incubado à 7ºC por 10 dias.

Há mais ou menos uma década atrás, psicrotróficos no leite eram chamados psicrófilos e afirmava-se que eram destruídos numa pasteurização bem feita (SEKHAR, 1946 ; ROGICK e BURGWALD, 1952 ; ANDREWS e KAUFFMAN, 1953 ; A. P. H. A., 1960 ; WITTER, 1961).

EDDY (1960), sugeriu que o termo psicrotrófico fosse usado para indicar os microrganismos, que são capazes de crescer à baixas temperaturas.

Normalmente as práticas executadas na indústria de laticínios utilizam grandes volumes de leite cru que permanecem armazenados à temperaturas de refrigeração por longos períodos, durante os quais as bactérias psicrotróficas podem crescer, causando mudanças indesejáveis no leite e seus derivados (ANDREY e FRAZIER, 1959 e MORSE *et alii*, 1968). A presença de organismos psicrotróficos não somente indica baixa qualidade do leite, como também insatisfatórias condições sanitárias no processamento.

Os microrganismos psicrotróficos, podem causar muitos danos no leite e seus derivados, quando estocados em temperaturas que vão de 1 - 7ºC (ELLIKER *et alii*, 1964 ; THOMAS *et alii*, 1966 ; FORD e BABEL, 1969 e LUCK, 1972).

BABEL (1953), encontrou que a acidez da gordura do leite, aumenta lentamente quando este é mantido à 4,4ºC , mas

aumenta rapidamente quando há uma elevação marcante no número de organismos psicrotróficos.

MARTH e FRAZIER (1957), mostraram que os psicrotrófi - cos predominantes em leite cru comercial são: *Pseudomonas* , *A-chromobacter* e *Flavobacterium*.

No trabalho de ANDREY e FRAZIER (1959), bactérias psicrotróficas foram isoladas de 174 amostras de leite tipo A . Os isolados obtidos foram identificados e a maioria pertenceu aos gêneros: *Aerobacter* , *Alcaligenes* , *Arthrobacter* , *Flavobacte - rium* , *Micrococcus* e *Pseudomonas*. Foi ainda observado que o pastoreio extensivo ou o tratamento em confinamento, tem grande influência no número de psicrotróficos. Assim, *Arthrobacter* , seguido por *Pseudomonas* e *Micrococcus* , predominaram quando as vacas estavam confinadas e *Flavobacterium* e *Alcaligenes* , quando em pastoreio extensivo.

O número de organismos psicrotróficos no leite é frequentemente usado para avaliação da qualidade do produto. O procedimento convencional para contagens de psicrotróficos requer 10 dias de incubação à 7ºC , entrentanto, OLIVERIA e PARMELEE (1976), mostraram que as bactérias psicrotróficas do leite crescem bem à 21ºC , enquanto que as mesófilas crescem bastante lentamente à esta temperatura. Eles encontraram que incubação à 21ºC por 25 horas é equivalente à incubação à 7ºC por 10 dias.

Segundo alguns autores (WITTER, 1961 e THOMAS e DRUCE, 1969), organismos psicrotróficos, não sobrevivem à pasteurização

e assim, sua presença em leites processados é devido à contaminação após a pasteurização. Alguns pesquisadores, entretanto, tem mostrado que pequeno número de organismos psicrotróficos pode sobreviver à pasteurização e esterilização (GROSSKOPF e HARPER, 1969 ; WATROUS *et alii*, 1971 e PATEL e BLANKENAGEL, 1972). Mas, THOMAS e DRUCE (1969) e BHADSAVLE *et alii* (1972), mostraram que leite pasteurizado deve ser estocado à 7ºC pelo menos uma semana, antes dos psicrotróficos resistentes ao calor, poderem ser detectados (tempo necessário para o reparo das células danificadas).

JUFFS e BABEL (1975), utilizaram várias culturas de bactérias láticas afim de conseguirem inibição de bactérias psicrotróficas e verificaram ser *Leuconostoc cremoris* a mais efetiva. Por outro lado, OVERCAST e ATMARAM (1974), mostraram que o crescimento excessivo das bactérias gram negativas no leite antes do processamento, pode ter um efeito estimulante no crescimento subsequente de organismos psicrotróficos formadores de esporos.

Bactérias psicrotróficas dos gêneros: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes*, podem produzir enzimas, como lipases e proteinases, as quais não são inativadas pela pasteurização (COUSINS *et alii*, 1977). Essas bactérias e outras pertencentes aos gêneros *Citrobacter* e *Bacillus*, são também produtoras de fosfolipase C . Existem poucas referências na literatura sobre os efeitos da fosfolipase C em leite

e em outros alimentos, porém, o trabalho de FOX *et alii* (1976), mostrou que organismos psicrotróficos produtores de fosfolipase C , frequentemente estão presentes em grandes números em leites deteriorados.

3.8 - Bactérias Termófilas

Deve-se considerar o fato de que quando leite com alta população inicial de organismos termo-resistentes é desidratado, eles podem sobreviver em números suficientes para representar um risco na qualidade do produto quando o mesmo for reconstituído e usado em alimentos (THOMPSON *et alii*, 1978).

A presença de microrganismos no leite em pó, vem confirmar o trabalho de KEOGH (1971), que mostrou que o tratamento térmico que o leite recebe durante a secagem não elimina todas as bactérias e a maioria dos organismos presentes no leite em pó são formadores de esporos ou termo-resistentes, como: *Micrococcus* e outras microbactérias.

Segundo JONES e LANGLOIS (1977), em leite e derivados, ocorrem números mais ou menos parecidos de termófilos e esporulados, mostrando que provavelmente os termófilos encontrados são produtores de esporos.

3.9 - Enterococos

Os enterococos são membros do gênero *Streptococcus* que consistem de cocos gram positivos, produzindo cadeias curtas ou longas e que diferem da maioria dos outros cocos gram positivos por serem catalase negativos.

Apesar da existência de certas discussões sobre quais as espécies de *Streptococcus* que deveriam ser incluídas no termo Enterococos, parece ser aceito que os enterococos são membros dos Estreptococos do grupo serológico D . Este grupo consiste de quatro espécies distintas:

Streptococcus faecalis [var. *liquefaciens*
var. *zymogenes*]

Streptococcus faecium var. *durans*

Streptococcus bovis

Streptococcus equinus

Os enterococos de maior importância em alimentos pertencem as espécies: *S. faecalis* e *S. faecium*.

Em relação aos padrões para enterococos atualmente em uso, admite-se que em geral não devem existir em mais que 1.000 organismos por grama de alimento (A.P.H.A., 1967).

Espécies de enterococos consideradas termodúricas, são capazes de crescer à baixas temperaturas (JENSEN *et alii*, 1975 e TINUOYE e HARMON, 1975).

S. faecalis var. *liquefaciens*, é considerada uma bactéria que altera o sabor e a qualidade do leite, sendo portanto, indesejável em tal produto (WASHAM *et alii*, 1977).

3.10 - Fungos e Leveduras

Certos fungos como *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* , são necessários para a maturação dos respectivos queijos, pois suas atividades proteolíticas e lipolíticas são responsáveis pelo sabor e aroma característicos, bem como pela aparência de tais produtos (FOSTER *et alii*, 1957).

Porém, outros fungos podem ser responsáveis pela deterioração do produto, ou por mudanças indesejáveis que tornam o produto de baixa qualidade e de difícil comercialização. Assim, espécies de *Aspergillus* , tem sido encontradas em latas de leite condensado açucarado, onde crescem por um tempo limitado e formam botões. Normalmente, coagulam a caseína do leite (FOSTER *et alii*, 1957).

Segundo os mesmos autores, espécies de *Cladosporium* e *Alternaria* , têm sido encontradas causando discoloração da superfície de manteigas, o que é bastante indesejável.

Geotrichum candidum (antes denominado *Oospora lactis* e *Oidium lactis*), oxida o ácido lático do leite e derivados à gás carbônico e água e isso rapidamente hidrolisa a gordura do creme da manteiga. Esse fungo, cresce na superfície do creme e queijos

azedos, como uma firme massa branca. Ele é responsável pela produção de sabores desagradáveis nos derivados do leite. Não é um fungo sacarolítico e sua importância reside em suas características oxidativas e lipolíticas. Ele é destruído pela pasteurização e sua presença no creme pasteurizado e na manteiga é interpretada como indicador de falhas no processamento ou recontaminação (FOSTER *et alii*, 1957).

Segundo BRINDLEY (1954), os fatores que parecem estar envolvidos com a presença de certos fungos e bactérias indesejáveis no queijo, são: controle inadequado da ventilação durante a drenagem e formação da casca, viragens insuficientes do queijo e poucas mudanças das bandagens.

No trabalho de FRYER e SHARPE (1965), uma linhagem de *Streptomyces albus* , presumivelmente originária do leite cru, foi encontrada em grande número em queijos cheddar. O número de *Streptomyces* , permaneceu constante, por um período de quatro meses. A resistência ao calor foi examinada para as células miceliais e conídios, usando-se 62,5 e 71,7ºC. As células miceliais não mostraram resistência às temperaturas citadas, sendo 100% a porcentagem de morte. Os conídios entretanto, foram muito menos afetados depois de duas horas à 62,5 e 3% permaneceram viáveis depois de 30 minutros à 71,7ºC .

SHAHANI (1974), relacionou alguns tipos de lipases microbianas, incluindo: espécies de leveduras dos gêneros *Candida* e *Torulopsis* e espécies de fungos dos gêneros *Rhizopus* ,

Penicillium , *Aspergillus* , *Geotrichum* e *Mucor*.

De acordo com KOSIKOWSKI (1970), uma só contagem deve ser efetuada para se estimar fungos e leveduras em um alimento , ou seja, ambos devem ser incluídos na mesma contagem.

A presença de fungos e outras evidências visuais ou olfativas de deterioração, são aceitas como causa de rejeição de um produto alimentício (HOBBS e GILBERT, 1974).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

As amostras dos derivados do leite utilizadas neste trabalho, foram adquiridas no comércio local de Piracicaba e conduzidas imediatamente ao laboratório para serem examinadas.

No presente trabalho as seguintes amostras, com três repetições de cada uma, identificadas como A , B e C , foram analisadas:

A - Queijo Tipo Prato
B - Queijo Tipo Minas Frescal
C - Queijo Tipo Provolone
D - Leite em Pó Integral
E - Leite em Pó Desnatado
F - Manteiga sem Sal
G - Manteiga com Sal

A amostragem foi feita usando-se um amostrador (trado) para queijos e manteigas, procurando-se tomar pontos bem esparsos da superfície do produto. O amostrador foi introduzido por toda a altura da amostra e 50 g foram tomados para análise. Para leite em pó, foram tomadas 50 g da embalagem comercial. Para cada uma das amostras, os 50 g foram colocados em liquidificador contendo 450 ml de solução de citrato de sódio (2%) e batidos por dois minutos. Foram preparadas diluições em série utilizando-se água peptonada (0,1%) estéril.

Para todas as determinações, as contagens das colônias foram realizadas em contador tipo Quebec.

4.1 - Contagem Total

Feita por plaqueamento das diluições em série em meio padrão, segundo SHARF (1972). A contagem das colônicas foi efetuada após incubação por 48 horas à 32ºC .

4.2 - Coliformes

A metodologia empregada para contagem e caracterização desse grupo de microrganismos seguiu as especificações do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A. P. H. A., 1972), tendo sido empregado Vermelho Violeta Bile Agar como meio

seletivo e incubação à 32ºC por 48 horas. Para caracterização dos coliformes presentes, dez colônias ao acaso foram retiradas (SHARF, 1972) e colocadas em tubos de ensaio contendo leite tornassolado, sendo incubados à 32ºC por 24 horas. Depois de realizar coloração de Gram para estas culturas, foi feito plaqueamento por estrias em meio Eosina Azul de Metileno incubado à 32ºC por 24 horas. Em seguida, foram realizados os testes bioquímicos: Produção de Indol, Prova de Vermelho de Metila e Voges Proskrauer, e Utilização de Citrato (IMViC), para diferenciação de *Escherichia coli* e *Aerobacter aerogenes*. A enumeração de coliformes fecais, foi feita com caldo *E. coli* em tubos de ensaios contendo tubos de Durham invertidos e mantidos em banho maria à 45,5ºC por 24 horas.

4.3 - *Staphylococcus*

Para isolamento e contagem desses organismos, placas com Nutriente Agar, Extrato de Levedura (0,3%) e 7,5% de cloreto de sódio (DIFCO MANUAL, 1957), inoculadas com diluições em série, foram incubadas à 32ºC por 48 horas, sendo feita contagem das colônias depois desse período. Das placas contadas, foram retiradas dez colônias ao acaso (SHARF, 1972), as quais foram transferidas para tubos de ensaio com Caldo Nutriente mais 7,5% de cloreto de sódio e incubados à 32ºC por 24 horas. Em seguida, foi feita coloração de Gram. Para a caracterização de *S. aureus*, foram realizados os testes bioquímicos IMViC ; plaqueamento por estrias

de todas as culturas em meio de Baird-Parker com incubação à 35ºC por 48 horas e teste para produção de coagulase (Laboratory Exercices for Food Microbiology, BANWART, 1975).

4.4 - *Salmonella*

O isolamento e a identificação de *Salmonella* , foram feitos segundo as normas do Laboratory Exercices for Food Microbiology (BANWART, 1975). Para o isolamento, 25 g do produto foram colocados juntamente com 225 ml de Caldo Selenito Cistina em liquidificador e batidos durante dois minutos, com posterior incubação à 35ºC por 24 horas (enriquecimento). Em seguida, foi feito plaqueamento, por estrias, nos meios seletivos: Verde Brilhante Agar (VBA), com incubação à 35ºC por 24 horas, Bismuto Sulfito Agar (BSA) com incubação à 35ºC por 48 horas e *Salmonella Shigella* Agar (SSA) com incubação à 35ºC por 24 horas. Depois desse período, colônias típicas de *Salmonella* de cada um dos meios seletivos, foram transferidas com agulha de platina, para tubos de ensaio com meio Triple Sugar Iron Agar (TSI) inclinado e incubados à 35ºC por 24 horas. A seguir foi feita coloração de Gram. Para a comprovação da presença de *Salmonella* , foram realizados os testes bioquímicos descritos no Laboratory Exercices for Food Microbiology (BANWART, 1975).

4.5 - Proteolíticos

Placas com meio padrão para contagem total (SHARF, 1972), mais 1% de leite desnatado esterilizado, inoculadas com diluições em série, foram incubadas à 32ºC por 48 horas. Em seguida, foi feita contagem das colônias de proteolíticos (com um halo de proteólise ao redor da colônia),segundo as normas do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1972).

4.6 - Lipolíticos

Placas com meio Azul Espírito Agar, inoculadas com diluições em série, foram incubadas à 32ºC por cinco dias e depois desse período, colônias típicas de organismos lipolíticos (envoltas por uma zona azul), foram contadas. Laboratory Exercices for Food Microbiology (BANWART, 1975).

4.7 - Psicrotróficos

Para esse grupo de microrganismos, também se empregou o meio para contagem total (SHARF, 1972), com incubação à 21ºC por 25 horas (OLIVERIA e PARMELEE, 1976) e 7ºC por dez dias, de acordo com as recomendações do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1972), sendo a contagem das colônias feita após esse período.

4.8 - Termófilos

O meio utilizado foi o mesmo empregado para a contagem total (SHARF, 1972), porém com incubação à 55ºC por 48 horas, segundo as normas do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1972), sendo feita contagem das colônias depois desse período.

4.9 - Enterococos

O método empregado seguiu as especificações do Laboratory Exercices for Food Microbiology (BANWART, 1975), sendo as placas inoculadas com diluições apropriadas contendo meio KF *Streptococcus* Agar , incubadas à 32ºC por 48 horas. Depois desse período as colônias típicas de enterococos (vermelhas), foram contadas.

4.10 - Fungos e Leveduras

A contagem desses organismos foi feita por plaqueamento das diluições em série em placas com meio de Malte (pH = 3,5) incubadas à 32ºC por cinco dias. A primeira contagem foi realizada depois de três dias de incubação e ambos os microrganismos foram colocados numa só contagem, de acordo com KOSIKOWSKI (1970).

4.11 - Esporulados Aeróbicos

Para a contagem desses organismos, 5 g de leite em pó de cada amostra foram pesados e diluídos em 45 ml de água destilada estéril, com aquecimento de 80ºC por dez minutos. Foi realizado plaqueamento em meio padrão para contagem total (SHARF, 1972) com incubação de 32ºC por 24 horas, sendo em seguida feita contagem das colônias (Standard Methods for the Examination of the Dairy Products, A.P.H.A., 1972).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas determinações microbiológicas para as amostras de derivados do leite utilizadas neste trabalho, encontram-se nas Tabelas 1 , 2 e 3 . Os números representam valores médios, já que todas as determinações foram conduzidas em duplicata.

5.1 - Queijos

5.1.1 - Contagem total

Os resultados obtidos para os três tipos de queijos analisados (Tabela 1), variaram de $8,0 \times 10^6$ à $2,3 \times 10^7$ microrganismos / g para queijo tipo Prato ; de $1,6 \times 10^8$ à $2,2 \times 10^8$

microrganismos / g para queijo tipo Minas Frescal e de $1,0 \times 10^7$ à $2,0 \times 10^7$ microrganismos / g para queijo tipo Provolone, sendo as maiores contagens para o tipo Minas Frescal, o que era de se esperar devido ao seu alto teor de umidade. As altas contagens encontradas para os queijos Prato e Provolone podem indicar que os mesmos, apresentam alta atividade de água, ou que, o período de maturação fora curto, permitindo que um número elevado de bactérias láticas permaneçam vivas, uma vez que o número dessas bactérias em queijos é grandemente afetado pela atividade de água (aw) , a qual diminui com o prolongamento da maturação.

5.1.2 - Coliformes

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos tanto para coliformes totais como para coliformes fecais nas amostras analisadas, os quais oscilaram de $6,3 \times 10^2$ à $2,0 \times 10^3$ coliformes totais/g para queijo tipo Prato , de $8,5 \times 10^4$ à $1,7 \times 10^5$ coliformes totais/g para queijo tipo Minas Frescal , de $3,0 \times 10^2$ à $8,8 \times 10^2$ coliformes totais/g para queijo tipo Provolone e de $4,0 \times 10^2$ à $1,2 \times 10^3$ coliformes fecais/g para queijo tipo Prato ; de $4,0 \times 10^4$ à $1,6 \times 10^5$ coliformes fecais/g para queijo tipo Minas Frescal, e, para queijo tipo Provolone, ausência completa de coliformes fecais nas amostras analisadas. As contagens para *E. coli* , variaram de $4,0 \times 10^2$ à $1,1 \times 10^3$ / g para queijo Tipo Prato , de $2,9 \times 10^4$ à $1,6 \times 10^5$ / g , para queijo tipo Minas Fres -

cal e nenhuma das amostras de queijo tipo Provolone analisadas apresentou essa bactéria. Esses resultados estão acima dos padrões estabelecidos pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA, 1978), que são de 10^2 coliformes fecais/g para queijo Frescal e 10 coliformes fecais/g para queijo curado, como é o caso dos queijos tipo Prato e Provolone. Essas contagens são também superiores aos padrões estabelecidos pelo Instituto Canadense de Proteção à Saúde (COLLINS - THOMPSON *et alii*, 1977), que são: $m = 5,0 \times 10^2$ / g (nível de microrganismos aceitável) e $M = 1,5 \times 10^3$ / g (nível de microrganismos não aceitável) para coliformes totais e $m = 1,0 \times 10^2$ / g e $M = 5,0 \times 10^2$ / g para coliformes fecais, para queijos feitos de leite pasteurizado. Vê-se que somente as amostras de queijo tipo Provolone se enquadraram nos padrões acima referidos. Os resultados da Tabela 1 mostram que as amostras de queijo tipo Minas Frescal (queijo mole) apresentaram valores acima de $1,6 \times 10^3$ coliformes fecais/g , os quais são semelhantes aos encontrados por COLLINS-THOMPSON *et alii* (1977), em queijos de pasta mole. A presença de grande número de coliformes em queijos, normalmente se deve a contaminação após a pasteurização ou à baixa atividade da cultura iniciadora (produtores de ácido) , (FRANK *et alii*, 1977). YALE (1943) , DELAY (1947) e ERNSTROM (1954), mostraram que a presença de *E. coli* em produtos láteos pode ser utilizada como indicador de contaminação após a pasteurização ou à baixa atividade da cultura iniciadora e assim, a constatação da presença de

E. coli em amostras de queijos tipo Minas Frescal e Prato, demonstra que práticas inadequadas sob o ponto de vista higiênico estão sendo empregadas no processamento de tais produtos.

5.1.3 - *Staphylococcus*

Os padrões propostos pela CNNPA (1978), em relação à *S. aureus* em derivados do leite, são os seguintes: 10^3 / g para queijo Frescal e 10^2 / g para queijo curado. Os resultados obtidos para esse microrganismo nas amostras analisadas (Tabela 1), mostraram variações de 2,9 x 10^4 à 4,4 x 10^4 microrganismos/g para queijo tipo Prato, de 3,3 x 10^5 à 3,7 x 10^5 microrganismos/g para queijo tipo Minas Frescal, e para queijo tipo Provolone de 1,2 x 10^4 à 2,3 x 10^4 microrganismos/g , sendo bastante superiores nos padrões acima citados. MUSSOI (1974), entretanto, analisando queijos tipo Lanche e Prato, não constatou a presença desse microrganismo nesses produtos. Os resultados obtidos são também superiores aos padrões apresentados pelo Instituto Canadense de Proteção à Saúde (COLLINS-THOMPSON *et alii*, 1977), que são: m = 1,0 x 10^2 / g e M = 1,0 x 10^3 / g para queijos feitos de leite pasteurizado. A alta incidência de *S. aureus* em queijos,mostra que a pasteurização do leite não foi adequada, uma vez que

esse microrganismo é destruído por esse tratamento térmico (TROLLER, 1976).

READ *et alii* (1963), concluíram que alimentos contendo cerca de 5,0 x 10^5 *Staphylococcus* coagulase positivos/g devem ser considerados impróprios ao consumo humano, devido a produção significativa de enterotoxinas. Os números encontrados para esse microrganismo nas amostras de queijo tipo Minas Frescal (Tabela 1) estão bastante próximos dos valores mencionados pelos autores acima, o que leva a crer que as mesmas também podem ser consideradas inadequadas ao consumo. O grande número de *S. aureus* encontrado em queijos pode ser o resultado de baixa atividade da cultura iniciadora (produtores de ácido), uma vez que *Staphylococcus* coagulase positivos, multiplicam-se rapidamente durante a elaboração de queijos, nos quais os organismos produtores de ácidos (bactérias láticas), tenham sido contaminados por fagos (SHARPE *et alii*, 1962 e REITER, 1964).

5.1.4 - *Salmonella*

De acordo com os padrões apresentados pela CNNPA (1978), esse organismo não deve aparecer em 25 g do produto. No entanto, os resultados da Tabela 1 , mostram que uma das amostras de queijo tipo Minas Frescal e outra de queijo tipo Prato, foram positivas para *Salmonella* , o que demonstra que os mesmos não deveriam ser postos à venda, uma vez que estão fora dos limites

estabelecidos pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, pois se constituem num grande risco de infecção para a população que os consome. A presença de tais microrganismos em alimentos, pode ser correlacionada também com falta de higienização, falhas no tratamento térmico durante o processamento do produto e/ou pós contaminação do mesmo .

5.1.5 - Fungos e leveduras

Os resultados da Tabela 1 para esses microrganismos apresentaram oscilações de $1,5 \times 10^4$ à $1,6 \times 10^5$ microrganismos/g para queijo tipo Prato , de $2,4 \times 10^3$ à $7,0 \times 10^3$ microrganismos/g para queijo tipo Minas Frescal e para o queijo tipo Provolone de $5,1 \times 10^4$ à $5,4 \times 10^4$ microrganismos/g. Essas variações são semelhantes àquelas encontradas por MUSSOI (1974), que foram de 10^4 à 10^6 para queijos tipo Prato e Lanche. Embora não existam padrões nacionais estabelecidos para esses grupos de microrganismos em produtos láteos, é sabido que a presença de fungos é aceita como causa de rejeição de um produto alimentício (HOBBS e GILBERT, 1974). Esses microrganismos normalmente alcançam os alimentos na fase de acondicionamento do produto e também através de contaminações pelos equipamentos durante a elaboração, controle inadequado da ventilação durante a drenagem e formação da casca, viragens insuficientes do queijo e poucas mudanças das bandagens (BRINDLEY, 1954).

5.1.6 - Psicrotróficos

Sabe-se que microrganismos psicrotróficos são indesejáveis em produtos lácteos, uma vez que podem causar alterações indesejáveis no sabor e aroma desses alimentos (WEICKBACH e LANGLOIS, 1977). As contagens encontradas para esses microrganismos em queijos (Tabela 1) , mostram que incubação à 7ºC / 10 dias e a 21ºC / 25 horas foram equivalentes, como foi demonstrado por OLIVERIA e PARMELEE (1976). A amostra C do queijo tipo Prato não apresentou contagens desses organismos em nenhuma das temperaturas de incubação utilizadas, enquanto que as amostras A e B do mesmo tipo de queijo apresentaram variações de $4,0 \times 10^1$ a $1,3 \times 10^2$ microrganismos/g , quando incubadas a 7ºC / 10 dias e de $4,5 \times 10^1$ à $1,5 \times 10^2$ microrganismos/g , quando incubadas a 21ºC / 25 horas. Para as amostras de queijo tipo Minas Frescal as variações foram de $2,5 \times 10^2$ à $7,9 \times 10^2$ microrganismos/g para incubação a 7ºC / 10 dias e de $2,0 \times 10^2$ à $8,0 \times 10^2$ microrganismos/g para incubação a 21ºC / 25 horas. Nenhuma das amostras de queijo tipo Provolone analisadas apresentou contagens desses microrganismos em ambos os tipos de incubação empregados. Embora não existam padrões estabelecidos para a presença desses microrganismos em derivados do leite, pode-se concluir que falhas no controle da temperatura de pasteurização possivelmente devem ter ocorrido, uma vez que, a grande maioria dos organismos psicrotróficos é destruída numa pasteurização bem efetuada, como demonstrado por THOMAS e SEKHAR (1946) ; ROGICK e BURGWALD (1952)

e ANDREWS e KAUFFMAN (1953).

5.1.7 - Termófilos

As contagens para esses microrganismos variaram de $1,0 \times 10^1$ à $1,7 \times 10^2$ microrganismos/g para queijo tipo Prato , de $7,2 \times 10^2$ à $9,9 \times 10^2$ microrganismos/g para queijo tipo Provolone e em nenhuma das amostras de queijo tipo Minas Frescal foi constatada a presença desses microrganismos (Tabela 1). Embora a CNNPA (1978), não estabeleça limites para a presença desses organismos em leite e derivados, sabe-se que os tratamentos térmicos empregados na elaboração de queijos não são suficientes para eliminar as bactérias termófilas e como normalmente elas são formadoras de esporos, estes permanecem no alimento podendo em seguida germinarem e colocarem em risco a qualidade do produto (KEOGH, 1971).

5.1.8 - Enterococos

A Tabela 1 mostra oscilações de $1,2 \times 10^4$ à $2,5 \times 10^4$ microrganismos/g para queijo tipo Prato , de $1,3 \times 10^5$ à $2,8 \times 10^5$ microrganismos/g para queijo tipo Minas Frescal e de $2,9 \times 10^4$ à $7,7 \times 10^5$ microrganismos/g para queijo tipo Provolone. Apesar de não existirem padrões nacionais que limitem a presen

ça desses microrganismos, o valor máximo estabelecido pela American Public Health Association (1967), é de 10^3 enterococos / g de alimento. Os resultados obtidos nesse trabalho são bastante superiores ao padrão acima mencionado, o que demonstra a necessidade de se estabelecerem limites para a presença de tais microrganismos em alimentos, uma vez que, além de causarem alterações no sabor e aroma de leite e derivados (WASHAM *et alii*, 1977), podem se constituir em agentes causais de infecções ao homem (BRYAN, 1973).

5.1.9 - Proteolíticos

As contagens de proteolíticos (Tabela 1), variaram de $2,6 \times 10^2$ à $6,4 \times 10^2$ microrganismos/g para queijo tipo Prato, de $4,0 \times 10^4$ à $7,8 \times 10^4$ microrganismos/g para queijo tipo Minas Frescal e para queijo tipo Provolone de $2,0 \times 10^4$ à $1,2 \times 10^5$ microrganismos/g. A não existência de padrões para a presença desses microrganismos em derivados do leite, não permitem um julgamento preciso da influência de tais organismos na qualidade dos produtos analisados, mas é importante que o número deles seja o mais reduzido possível, pois vários trabalhos já mostraram que proteases produzidas por esses microrganismos alteram as qualidades dos produtos láteos, tornando-os amargos devido à formação de polipeptídeos e, portanto, inadequados para o

consumo (MICKELSON *et alii*, 1967 ; CHUNG e CANNON, 1971 e MORENO e KOSIKOWSKI, 1973).

5.1.10 - Lipolíticos

Os números encontrados para esses microrganismos nas amostras analisadas (Tabela 1), mostram variações de $1,0 \times 10^3$ à $1,7 \times 10^3$ microrganismos/g para queijo tipo Prato , de $2,7 \times 10^4$ à $9,1 \times 10^4$ microrganismos/g para queijo tipo Minas Frescal e de $2,3 \times 10^4$ à $2,4 \times 10^4$ microrganismos/g para queijo tipo Provolone. Os valores elevados encontrados para tais microrganismos representam um risco em relação a qualidade do alimento, uma vez que as lipases produzidas por tais microrganismos podem causar alterações indesejáveis no sabor e aroma dos queijos. Sabe-se que uma pasteurização bem feita destroe as células vegetativas dos organismos lipolíticos e assim, o grande número verificado, deve-se, provavelmente, à contaminação após a pasteurização. Além do número de células presentes, temos que considerar também o fato de que a pasteurização não elimina as lipases produzidas por muitos organismos lipolíticos e estas, subsequentemente, causam excessiva lipólise e rancidez nos queijos (PINHEIRO *et alii*, 1965). Seria, portanto, interessante que técnicas adequadas fossem adotadas para reduzir ao mínimo a presença desses microrganismos em derivados do leite, como é o caso de queijos.

5.2 - Leite em Pó

5.2.1 - Contagem total

Os resultados obtidos para as amostras analisadas (Tabela 2), variaram de $9,2 \times 10^5$ à $1,1 \times 10^6$ microrganismos/g para leite em pó integral e de $3,2 \times 10^5$ à $8,6 \times 10^5$ microrganismos/g para leite em pó desnatado. Esses resultados são superiores aos padrões estabelecidos pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA, 1978) , que são de $5,0 \times 10^4$ microrganismos/g e estão também acima dos padrões bacterianos estabelecidos pelo American Dry Milk Institute (1973), que permitem no máximo $5,0 \times 10^4$ microrganismos/g para o tipo extra e $1,0 \times 10^5$ microrganismos/g para o tipo padrão. Os valores encontrados são semelhantes aos resultados obtidos por JONES e LANGLOIS (1977), que encontraram 15,6% das amostras de leite em pó integral e 30,1% das amostras de leite em pó desnatado, contendo números superiores à $2,0 \times 10^4$ microrganismos/g. Esses resultados elevados indicam possíveis irregularidades durante o processamento e acondicionamento, ou seja, falhas no controle da temperatura de pasteurização, sanificação deficiente dos equipamentos envolvidos na elaboração desse produto, ou matéria prima com carga microbiana elevada.

5.2.2 - Coliformes

Nenhum organismo do grupo coliforme foi isolado das amostras de leite em pó integral e desnatado (Tabela 2). De acordo com esses resultados esses produtos se enquadram nos padrões da CNNPA (1978) e também nos padrões do American Dry Milk Institute (1973), que são, ausência de coliformes fecais/g e 10 coliformes totais/g de produto, respectivamente.

5.2.3 - *Staphylococcus*

Os padrões propostos pela CNNPA (1978), em relação à *S. aureus* em leite em pó são de 10 microrganismos/g de produto. A ausência de *S. aureus* nas amostras analisadas (Tabela 2), permite o enquadramento desse produto nos padrões acima referidos, o que os torna inócuos do ponto de vista de saúde pública.

5.2.4 - *Salmonella*

As amostras de leite em pó analisadas não apresentaram tal organismo em 25 g do produto. Esses resultados se enquadram nos padrões da CNNPA (1978) e também da Food and Drugs Act and Food and Drug Regulation (DNHW, 1977) , que estabelecem a ausência de *Salmonella* em 25 g do produto.

5.2.5 - Fungos e leveduras

Os resultados da Tabela 2 para esses microrganismos mostram variações de $1,5 \times 10^2$ à $6,7 \times 10^2$ microrganismos/g para leite em pó integral e contagem nula à $4,2 \times 10^1$ microrganismos/g para leite em pó desnatado, os quais são menores do que os valores estabelecidos pela CNNPA (1978), que são no máximo 10^3 organismos/g de produto. A presença desses organismos em leite em pó pode indicar uma possível contaminação durante o acondicionamento do mesmo.

5.2.6 - Psicrotróficos

Tanto as amostras incubadas à 21ºC / 25 horas como as incubadas à 7ºC / 10 dias, não apresentaram nenhum desenvolvimento, indicando, portanto, a ausência desses organismos no leite em pó. Isso está de acordo com a maioria dos autores (WITTER, 1961 e THOMAS e DRUCE, 1969), que afirmam que os organismos psicrotróficos não sobrevivem à uma pasteurização adequada, embora mais recentemente (WATROUS *et alii*, 1971 e PATEL e BLANKENAGEL, 1972), demonstraram que um pequeno número de psicrotróficos pode sobreviver à pasteurização. É sabido também que a presença de microrganismos psicrotróficos no leite e seus derivados pode afetar difetamente as suas qualidades (WEICKBACH e LANGLOIS, 1977).

5.2.7 - Termófilos

As contagens para esses organismos oscilaram de 3,2 x 10^2 à 6,1 x 10^2 microrganismos/g para leite em pó integral e de 5,0 x 10^1 à 1,1 x 10^2 microrganismos/g para leite em pó desnatado (Tabela 2). Embora a CNNPA (1978) não estabeleça limites para a presença desses organismos em leite e derivados, é sabido que tais microrganismos quando presentes em leite em pó, representam um risco para a qualidade dos produtos em que se utilizam leite em pó reconstituído (THOMPSON *et alii*, 1978). Desta forma, seria interessante que padrões fossem também estabelecidos para microrganismos termófilos, uma vez que, o processamento térmico que o leite recebe durante a sua desidratação não é suficiente para eliminar todas as bactérias presentes (KEOGH, 1971).

5.2.8 - Enterococos

As amostras de leite em pó analisadas (Tabela 2), mostram a ausência total desses microrganismos. Apesar de não existirem padrões nacionais para a presença de tais microrganismos nesse produto, os dados encontrados estão condizentes com aqueles estabelecidos pela American Public Health Association (1967), que limitam a presença de enterococos a não mais que 10^3 organismos/g. Isto porque esses organismos além de causarem alterações no sabor e aroma do leite e derivados (WASHAM *et alii*, 1977),

podem se constituir em agentes causais de infecções ao homem (BRYAN, 1973).

5.2.9 - Proteolíticos

As contagens de proteolíticos (Tabela 2), para todas as amostras analisadas, mostraram variações de $1,6 \times 10^3$ à $1,9 \times 10^3$ microrganismos/g para leite em pó integral e de $9,5 \times 10^2$ à $1,3 \times 10^3$ microrganismos/g para leite em pó desnatado. Apesar da não existência de limitações para a presença desses microrganismos em produtos lácteos, é de grande importância que o número deles seja reduzido, uma vez que, eles podem causar alterações no sabor e aroma dos diferentes produtos de leite (MICKELSON *et alii*, 1967 ; CHUNG e CANNON, 1971 e MORENO e KOSIKOWSKI, 1973).

5.2.10 - Lipolíticos

Os números de lipolíticos encontrados nas amostras analisadas (Tabela 2), são relativamente baixos, variando de $6,0 \times 10^1$ à $2,3 \times 10^2$ microrganismos/g para leite em pó integral e de $5,0 \times 10^1$ à $1,6 \times 10^2$ microrganismos/g para leite em pó desnatado. Entretanto, a presença desses microrganismos pode significar uma alta contaminação da matéria prima (leite), o que consequentemente, poderá trazer problemas para a conservação do leite

desidratado, pois os tratamentos térmicos a que é submetido durante o processamento, não são suficientes para destruir as lipases produzidas anteriormente (NASHIF e NELSON, 1953 ; PINHEIRO *et alii*, 1965 e LAW *et alii*, 1976).

5.2.11 - Esporulados aeróbicos

A Tabela 2 mostra as contagens para o grupo de esporulados aeróbicos, que variaram de $5,0 \times 10^2$ à $6,3 \times 10^2$ microrganismos/g para leite em pó integral e de $5,5 \times 10^1$ à $1,7 \times 10^2$ microrganismos/g para leite em pó desnatado. Esses resultados são intermediários àqueles encontrados por GOLDONI *et alii* (1977), em leite pasteurizado tipo C , porém, superiores àqueles verificados por BRUM e MUSSOI (1974), no mesmo tipo de leite. Isto pode indicar que os tratamentos térmicos empregados no processamento do leite em pó não foram suficientes para a completa destruição desses microrganismos.

5.3 - Manteigas

5.3.1 - Contagem total

As contagens totais obtidas para as amostras analisadas (Tabela 3), variaram de $1,8 \times 10^6$ à $2,5 \times 10^6$ microrganis -

mos/g para manteiga sem sal e de 1,1 x 10^6 à 1,5 x 10^6 microrganismos/g para manteiga com sal. Os resultados obtidos são inferiores aos números médios encontrados na contagem total de germes feita por BRUM (1974), também em amostras de manteigas, que foram de 2,9 x 10^6 microrganismos/ml de produto. Não existem padroẽs nacionais em relação à contagens totais para manteigas,mas números elevados de microrganismos indicam possíveis falhas durante o processamento e acondicionamento do produto e constituem um perigo em potencial para a qualidade do alimento, uma vez que quando altas contagens microbianas são observadas, há maior probabilidade da presença de organismos patogênicos e/ou deterioradores no produto.

5.3.2 - Coliformes

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para coliformes totais nas amostras utilizadas neste trabalho, os quais apresentaram variações de 2,5 x 10^4 à 2,8 x 10^4 microrganismos/g para manteiga sem sal e de 1,0 x 10^4 à 1,8 x 10^4 microrganismos / g para manteiga com sal. Nenhuma das amostras de manteiga com sal apresentou contagens tanto para *E. coli* como para coliformes fecais,porém a amostra A de manteiga sem sal apresentou o mesmo número para *E. coli* e coliformes fecais, ou seja, 6,0 x 10^2 e a amostra c também apresentou o mesmo valor para *E. coli* e coliformes fecais, ou seja, 5,0 x 10^2. Os resultados para colifor-

mes totais são inferiores aos obtidos por BRUM (1974), que tiveram média de 4,5 x 10^4 microrganismos/ml. Segundo o mesmo autor a presença de microrganismos coliformes em alimentos sempre indica falta de higiene durante a obtenção da matéria prima, manipulação ou durante as fases da industrialização. De acordo com a American Association of Medical Milk Comissions (A.A.M.M.C. , 1960), a manteiga elaborada com métodos sanitários adequados não deve conter mais de 10 coliformes/ml. Apesar da não existência de padrões nacionais para esse grupo de organismos, sabe-se que coliformes são indicadores de falhas no processamento e sua presença em números elevados nos derivados do leite é normalmente devido a contaminações após a pasteurização (THOMSON, 1950).

5.3.3 - *Staphylococcus*

Os resultados obtidos para *S. aureus* nas amostras analisadas (Tabela 3), mostraram variações de 8,0 x 10^2 à 1,8 x 10^3 microrganismos/g para manteiga sem sal e contagem nula à 3,2 x 10^3 microrganismos/g para manteiga com sal. Embora a CNNPA não tenha estabelecido padrões para a presença desse microrganismo nesse produto as contagens encontradas evidenciam a ocorrência de possíveis falhas na pasteurização do creme para elaobração da manteiga, uma vez que *Staphylococcus* coagulase positivos não sobrevivem à uma pasteurização bem feita (TROLLER, 1976).

5.3.4 - *Salmonella*

De acordo com os padrões apresentados pela CNNPA (1978), esse organismo não deve aparecer em 25 g do produto. Entretanto, os resultados da Tabela 3 , mostram que uma das amostras de manteiga sem sal e outra amostra de manteiga com sal, foram positivas para *Salmonella* , o que as tornam veículos de infecções alimentares.

5.3.5 - Fungos e leveduras

As contagens da Tabela 3 para esses microrganismos mostram oscilações de $9,7 \times 10^3$ à $1,4 \times 10^4$ microrganismos/g para manteiga sem sal e de $9,8 \times 10^3$ à $1,0 \times 10^4$ microrganismos/g para manteiga com sal. Esses resultados são inferiores aos números obtidos para esses microrganismos no trabalho de BRUM (1974), que mostraram variação de $2,0 \times 10^2$ à $6,8 \times 10^5$ microrganismos / ml. A CNNPA ainda não estabeleceu limites para a presença desses microrganismos em derivados do leite, embora o número deva ser o mais reduzido possível, uma vez que a presença de fungos é aceita como causa de rejeição de um produto alimentício (HOBBS e GILBERT, 1974). Os defeitos normalmente encontrados em manteigas, devido ao crescimento de fungos, são a discoloração da superfície do produto e produção de sabores desagradáveis em razão de suas características oxidativas e lipolíticas. Porém,os fun

gos causadores desses defeitos, são destruídos pela pasteurização e suas presenças no creme pasteurizado e na manteiga, se devem à falhas no processamento ou à recontaminação (FOSTER *et alii*, 1957).

5.3.6 - Psicrotróficos

Os valores encontrados para esses microrganismos nesse produto (Tabela 3), também mostram que incubação à 7ºC / 10 dias, e à 21ºC / 25 horas são equivalentes, como foi demonstrado por OLIVERIA e PARMELEE (1976), uma vez que no presente trabalho, para as amostras de manteiga sem sal as variações foram de $1,3 \times 10^4$ à $1,7 \times 10^4$ microrganismos/g para incubação à 7ºC/10 dias e de $1,1 \times 10^4$ à $1,5 \times 10^4$ microrganismos/g para incubação à 21ºC / 25 horas, enquanto que para as amostras de manteiga com sal as oscilações foram de $7,3 \times 10^2$ à $8,1 \times 10^2$ microrganismos/g para incubação à 7ºC / 10 dias e de $6,8 \times 10^2$ à $8,1 \times 10^2$ microrganismos/g para incubçção à 21ºC / 25 horas. Valores superiores foram encontrados por BRUM (1974), em amostras de manteiga, com variação de $3,0 \times 10^3$ à $1,2 \times 10^6$ psicrotróficos/ml , com valor médio de $9,5 \times 10^4$ psicrotróficos/ml. Não existem limitações para a presença desses organismos em produtos láteos, mas a ocorrência desses microrganismos pode ser aliada à falhas no processamento e acondicionamento, já que esses microrganismos são na sua grande maioria destruídos por pasteurização adequadamente conduzida. Os mi

crorganismos psicrotróficos são indesejáveis nos derivados do leite por alterarem suas qualidades, principalmente quando estes são mantidos por longos períodos à temperaturas de refrigeração (WEICKBACH e LANGLOIS, 1977).

5.3.7 - Termófilos

As contagens para esses microrganismos nas amostras analisadas (Tabela 3), apresentaram variações de 3,1 x 10^2 à 4,4 x 10^2 microrganismos/g para manteiga sem sal e de 1,3 x 10^2 à 2,0 x 10^2 microrganismos/g para manteiga com sal. Não foram ainda estabelecidos padrões para esses organismos em leite e derivados, mas, sabe-se que muitos organismos termófilos, produzem esporos que sobrevivem aos tratamentos térmicos empregados na elaboração da manteiga, e, assim, podem permanecer no alimento e de acordo com a temperatura de armazenamento, germinarem e alterarem a qualidade do produto (KEOGH, 1971).

5.3.8 - Enterococos

A Tabela 3 mostra oscilações de 2,7 x 10^2 à 5,6 x 10^2 microrganismos/g para manteiga sem sal e de 7,0 x 10^1 à 1,3 x 10^2 microrganismos/g para manteiga com sal, nas amostras utilizadas neste trabalho. Padrões nacionais para a presença desses orga-

nismos em manteiga ainda não foram propostos, mas a American Public Health Association (1967), estabelece que um alimento não deve conter mais do que 10^3 enterococos/g. Pelos resultados obtidos, tanto as amostras de manteiga sem sal como as de manteiga com sal, podem ser enquadradas no padrão acima citado. Esses microrganismos quando aparecem em números elevados num alimento, podem causar alterações nas suas qualidades e serem agentes causais de infecções ao homem (BRYAN, 1973), tornando-se clara a necessidade do estabelecimento de padrões nacionais para a presença desses microrganismos em alimentos.

5.3.9 - Proteolíticos

Variações de $1,1 \times 10^5$ à $1,2 \times 10^5$ microrganismos/g para manteiga sem sal e de $1,6 \times 10^4$ à $2,0 \times 10^4$ microrganismos / g para manteiga com sal, foram encontradas nas amostras analisadas (Tabela 3). Embora não existam limitações para a presença desses microrganismos em alimentos, é importante que o número deles seja o mais reduzido possível, pois vários trabalhos já mostraram que as proteases produzidas por tais organismos alteram as qualidades dos derivados do leite (MICKELSON *et alii*, 1967 ; CHUNG e CANNON, 1971 e MORENO e KOSIKOWSKI, 1973).

5.3.10 - Lipolíticos

Os números encontrados para esses microrganismos nas amostras utilizadas neste trabalho (Tabela 3), mostram variações de $1,1 \times 10^3$ à $1,7 \times 10^3$ microrganismos/g para manteiga sem sal e de $1,0 \times 10^3$ à $1,1 \times 10^3$ microrganismos/g para manteiga com sal. Organismos lipolíticos podem crescer em cremes e manteigas refrigerados, acarretando o desenvolvimento de sabor e aroma amargos (ANDERSON e HARDENBERGH, 1932). Seria, portanto, interessante que maiores cuidados fossem tomados durante elaboração, acondicionamento e distribuição desses produtos, para se evitar a presença desses microrganismos e consequente alteração de suas qualidades organoléticas.

TABELA 1 - Números médios de microrganismos/g de produto

Queijos		Contagem Total	Coliformes Totais	*Escherichia coli*	Coliformes Fecais	*Staphylococcus*	*S. aureus*	Termófilos	Psicrotróficos 7ºC / 10 dias	Psicrotróficos 21ºC / 25 horas	Proteolíticos	Lipolíticos	Enterococos	Fungos e Leveduras	Salmonella em 25 g
Tipo Prato	A	$2,3x10^7$	$2,0x10^3$	$1,1x10^3$	$1,2x10^3$	$2,3x10^5$	$4,4x10^4$	$1,7x10^2$	$1,3x10^2$	$1,5x10^2$	$6,4x10^2$	$1,2x10^3$	$1,2x10^4$	$1,6x10^5$	+
	B	$8,0x10^6$	$6,5x10^2$	$4,0x10^2$	$4,0x10^2$	$1,1x10^5$	$3,1x10^4$	$1,5x10^1$	$4,0x10^1$	$4,5x10^1$	$3,2x10^2$	$1,0x10^3$	$1,6x10^4$	$1,5x10^4$	-
	C	$1,3x10^7$	$6,3x10^2$	$4,4x10^2$	$5,0x10^2$	$1,6x10^5$	$2,9x10^4$	$1,0x10^1$	*	*	$2,6x10^2$	$1,7x10^3$	$2,5x10^4$	$1,8x10^4$	-
Tipo Minas Frescal	A	$2,2x10^8$	$1,7x10^5$	$1,6x10^5$	$1,6x10^5$	$1,7x10^6$	$3,3x10^5$	*	$2,5x10^2$	$2,0x10^2$	$7,8x10^4$	$2,7x10^4$	$2,8x10^5$	$2,6x10^3$	-
	B	$1,6x10^8$	$8,5x10^4$	$2,9x10^4$	$4,0x10^4$	$1,9x10^6$	$3,7x10^5$	*	$7,9x10^2$	$8,0x10^2$	$5,0x10^4$	$9,1x10^4$	$1,5x10^5$	$7,0x10^3$	+
	C	$2,0x10^8$	$1,6x10^5$	$4,7x10^4$	$1,0x10^5$	$1,9x10^6$	$3,6x10^5$	*	$5,0x10^2$	$5,5x10^2$	$4,0x10^4$	$8,1x10^4$	$1,3x10^5$	$2,4x10^3$	-
Tipo Provolone	A	$2,0x10^7$	$8,8x10^2$	*	*	$1,2x10^6$	$1,2x10^4$	$7,2x10^2$	*	*	$2,0x10^4$	$2,3x10^4$	$7,7x10^5$	$5,1x10^4$	-
	B	$1,2x10^7$	$5,5x10^2$	*	*	$8,0x10^5$	$1,6x10^4$	$9,8x10^2$	*	*	$1,0x10^5$	$2,3x10^4$	$5,0x10^4$	$5,4x10^4$	-
	C	$1,0x10^7$	$3,0x10^2$	*	*	$7,3x10^5$	$2,3x10^4$	$9,9x10^2$	*	*	$1,2x10^5$	$2,4x10^4$	$2,9x10^4$	$5,3x10^4$	-

(*) Ausência de microrganismos nas diluições plaqueadas

(-) Ausência (+) Presença

TABELA 2 - Números médios de microrganismos/g de produto

Leite em Pó		Contagem Total	Coliformes Totais	*Staphylococcus*	Termófilos	Psicrotróficos 7ºC / 10 dias	Psicrotróficos 21ºC / 25 horas	Proteolíticos	Lipolíticos	Enterococos	Fungos e Leveduras	Esporulados Aeróbicos	Salmonella em 25 g
Integral	A	$9,2x10^5$	*	*	$3,5x10^2$	*	*	$1,9x10^3$	$6,0x10^1$	*	$1,5x10^2$	$5,7x10^2$	-
	B	$1,0x10^6$	*	*	$3,2x10^2$	*	*	$1,8x10^3$	$2,3x10^2$	*	$6,7x10^2$	$5,0x10^2$	-
	C	$1,1x10^6$	*	*	$6,1x10^2$	*	*	$1,6x10^3$	$1,8x10^2$	*	$4,5x10^2$	$6,3x10^2$	-
Desnatado	A	$3,2x10^5$	*	*	$5,0x10^1$	*	*	$1,3x10^3$	$5,0x10^1$	*	*	$5,5x10^1$	-
	B	$5,7x10^5$	*	*	$1,1x10^2$	*	*	$1,0x10^3$	$1,6x10^2$	*	$4,2x10^1$	$1,4x10^2$	-
	C	$8,6x10^5$	*	*	$9,0x10^1$	*	*	$9,5x10^2$	$8,0x10^1$	*	$3,0x10^1$	$1,7x10^2$	-

(*) Ausência de microrganismos nas diluições plaqueadas

(-) Ausência (+) Presença

TABELA 3 - Números médios de microrganismos/g de produto

Manteiga		Contagem Total	Coliformes Total	*Escherichia coli*	Coliformes Fecais	*Staphylococcus*	*S. aureus*	Termófilos	Psicrotróficos 7ºC / 10 dias	Psicrotróficos 21ºC / 25 horas	Proteolíticos	Lipolíticos	Enterococos	Fungos e Leveduras	Salmonella em 25 g
Sem Sal	A	$2,5x10^6$	$2,7x10^4$	$6,0x10^2$	$6,0x10^2$	$8,7x10^3$	$1,8x10^3$	$3,1x10^2$	$1,7x10^4$	$1,5x10^4$	$1,2x10^5$	$1,1x10^3$	$3,9x10^2$	$1,0x10^4$	-
	B	$2,4x10^6$	$2,8x10^4$	*	*	$9,9x10^3$	$1,0x10^3$	$4,0x10^2$	$1,3x10^4$	$1,2x10^4$	$1,2x10^5$	$1,7x10^3$	$2,7x10^2$	$9,7x10^3$	+
	C	$1,8x10^6$	$2,5x10^4$	$5,0x10^2$	$5,0x10^2$	$8,6x10^3$	$8,0x10^2$	$4,4x10^2$	$1,4x10^4$	$1,1x10^4$	$1,1x10^5$	$1,7x10^3$	$5,6x10^2$	$1,4x10^4$	-
Com Sal	A	$1,1x10^6$	$1,6x10^4$	*	*	$1,8x10^4$	$2,0x10^3$	$1,3x10^2$	$7,9x10^2$	$8,1x10^2$	$1,9x10^4$	$1,0x10^3$	$1,3x10^2$	$9,8x10^3$	+
	B	$1,5x10^6$	$1,0x10^4$	*	*	$1,6x10^4$	$3,2x10^3$	$1,7x10^2$	$7,3x10^2$	$6,8x10^2$	$2,0x10^4$	$1,1x10^3$	$9,0x10^1$	$9,9x10^3$	-
	C	$1,2x10^6$	$1,8x10^4$	*	*	$1,6x10^4$	*	$2,0x10^2$	$8,1x10^2$	$7,8x10^2$	$1,6x10^4$	$1,1x10^3$	$7,0x10^1$	$1,0x10^4$	-

(*) Ausência de microrganismos nas diluições plaqueadas

(-) Ausência (+) Presença

6 - CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, permitem algumas conclusões gerais, relacionadas com a qualidade de alguns derivados do leite, em função dos tipos de microrganismos encontrados:

a - O número e as espécies de microrganismos encontrados nos derivados do leite, indicam que há necessidade de maiores cuidados higiênicos no processamento, manuseio, transporte e distribuição desses produtos e também na higienização dos equipamentos que entram em contato direto com tais derivados.

b - A presença de microrganismos patogênicos nas amostras de derivados do leite analisadas, evidencia que melhores con

troles nas técnicas de processamento devem ser realizados, uma vez que esses microrganismos constituem perigo em potencial, sob o ponto de vista da saúde pública.

c - Com exceção do leite em pó, todos os derivados do leite analisados apresentaram contagem de patogênicos (Coliformes, Coliformes Fecais, Enterococos, *Staphylococcus* e *Salmonella*) quase sempre superiores aos limites estabelecidos pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.

d - As contagens de microrganismos (Psicrotróficos, Proteolíticos, Lipolíticos, Fungos e Leveduras e Enterococos), principais causadores de alterações de sabor e aroma dos produtos láteos, foram de uma maneira geral elevadas, o que concorre para o curto período de vida útil e à má qualidade desses produtos.

e - Os resultados encontrados demonstram também que um maior controle por parte dos poderes públicos deve ser executado para se evitar a distribuição e consumo de tais produtos.

f - Devido a equivalência entre as contagens de psicrotróficos a 7ºC / 10 dias e a 21ºC / 25 horas, torna-se evidente que a última condição é a mais indicada para a enumeração desses microrganismos em derivados do leite, em razão da maior rapidez na obtenção dos resultados.

f - Dadas as altas contagens de microrganismos alteradores das propriedades organoléticas (sabor e aroma) encontradas, pode-se concluir que o estabelecimento de padrões para tais organismos em derivados do leite, se faz necessário, para uma melhor avaliação da qualidade desses produtos.

7 - SUMMARY

This work was undertaken to identify the presence of pathogenics and quality deteriorating microorganisms in some dairy products, such as cheese ("Prato" , "Minas Frescal" and "Provolone"), butter (salty and unsalty) and powder milk (whole and skimmilk). Commercial samples were taken and analysed for: Total Count, Coliforms, Fecal Coliforms, *Staphylococcus* , Psychrotrophs, Thermophilics, Proteolytics, Lipolytics, Enterococci, *Salmonella* , and Molds and Yeasts.

The isolation of the microorganisms followed the procedures described by SHARF (1972). The identification was done according to the Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1972), Bergey's Manual of Determinative Bac

teriology (BUCHANAN e GIBBONS, 1975) and Laboratory Exercices for Food Microbiology (BANWART, 1975).

The following ranges of contamination per gram were found for "Prato" , "Minas Frescal" and "Provolone" cheeses, respectivily: Standard Plate Count: $8,0 \times 10^6$ to $2,3 \times 10^7$, $1,6 \times 10^8$ to $2,2 \times 10^8$ and $1,0 \times 10^7$ to $2,0 \times 10^7$; Coliform Plate Count: $6,3 \times 10^2$ to $2,0 \times 10^3$, $8,5 \times 10^4$ to $1,7 \times 10^5$ and $3,0 \times 10^2$ to $8,8 \times 10^2$; *Escherichia coli* Count: $4,0 \times 10^2$ to $1,1 \times 10^3$, $2,9 \times 10^4$ to $1,6 \times 10^5$ and none of the "Provolone" cheese samples showed the presence of this microorganism ; Fecal Coliform Count: $4,0 \times 10^2$ to $1,2 \times 10^3$, $4,0 \times 10^4$ to $1,6 \times 10^5$ and none fecal coliform was present in the "Provolone" cheese samples ; *Staphylococcus* Count: $1,1 \times 10^5$ to $2,3 \times 10^5$, $1,7 \times 10^6$ to $1,9 \times 10^6$ and $7,3 \times 10^5$ to $1,2 \times 10^6$; *S. aureus* Count: $2,9 \times 10^4$ to $4,4 \times 10^4$, $3,3 \times 10^5$ to $3,7 \times 10^5$ and $1,2 \times 10^4$ to $2,3 \times 10^4$; Thermophilic Count: $1,0 \times 10^1$ to $1,7 \times 10^2$, absence in "Minas Frescal" samples analysed and $7,2 \times 10^2$ to $9,9 \times 10^2$; Psychrotrophs Count (7ºC / 10 days): none to $1,3 \times 10^2$, $2,5 \times 10^2$ to $7,9 \times 10^2$ and absence in all "Provolone" samples worked ; Psychrotrophs Count (21ºC / 25 hours): none to $1,5 \times 10^2$, $2,0 \times 10^2$ to $8,0 \times 10^2$ and absence in all "Provolone" samples analysed ; Proteolytics Count: $2,6 \times 10^2$ to $6,4 \times 10^2$, $4,0 \times 10^4$ to $7,8 \times 10^4$ and $2,0 \times 10^4$ to $1,2 \times 10^5$; Lipolytics Count: $1,0 \times 10^3$ to $1,7 \times 10^3$, $2,7 \times 10^4$ to $9,1 \times 10^4$ and $2,3 \times 10^4$ to $2,4 \times 10^4$; Enterococci Count: $1,2 \times 10^4$ to

$2,5 \times 10^4$, $1,3 \times 10^5$ to $2,8 \times 10^5$ and $2,9 \times 10^4$ to $7,7 \times 10^5$; Molds and Yeasts Count: $1,5 \times 10^4$ to $1,6 \times 10^5$, $2,4 \times 10^3$ to $7,0 \times 10^3$ and $5,1 \times 10^4$ to $5,4 \times 10^4$; *Salmonella* : one sample of "Prato" cheese and one of "Minas Frescal" cheese were positive for this organism and all samples of "Provolone" cheese were negative.

The counts per gram found for salty and unsalty butter samples, were respectivily: Standard Plate Count: $1,1 \times 10^6$ to $1,5 \times 10^6$ and $1,8 \times 10^6$ to $2,5 \times 10^6$; Coliform Plate Count: $1,0 \times 10^4$ to $1,8 \times 10^4$ and $2,5 \times 10^4$ to $2,8 \times 10^4$; *E. coli* and Fecal Coliforms Counts: no fecal coliform was detected in salty butter samples and none to $6,0 \times 10^2$ in unsalty butter samples ; *Staphylococcus* Count: $1,6 \times 10^4$ to $1,8 \times 10^4$ and $8,6 \times 10^3$ to $9,9 \times 10^3$; *S. aureus* Count: none to $3,2 \times 10^3$ and $8,0 \times 10^2$ to $1,8 \times 10^3$; Thermophilic Count: $1,3 \times 10^2$ to $2,0 \times 10^2$ and $3,1 \times 10^2$ to $4,4 \times 10^2$; Psychrotrophs Count (7ºC / 10 days): $7,3 \times 10^2$ to $8,1 \times 10^2$ and $1,3 \times 10^4$ to $1,7 \times 10^4$; Psychrotrophs Count (21ºC / 25 hours): $6,8 \times 10^2$ to $8,1 \times 10^2$ and $1,1 \times 10^4$ to $1,5 \times 10^4$; Proteolytics Count: $1,6 \times 10^4$ to $2,0 \times 10^4$ and $1,1 \times 10^5$ to $1,2 \times 10^5$; Lipolytics Count: $1,0 \times 10^3$ to $1,1 \times 10^3$ and $1,1 \times 10^3$ to $1,7 \times 10^3$; Enterococci Count: $7,0 \times 10^1$ to $1,3 \times 10^2$ and $2,7 \times 10^2$ to $5,6 \times 10^2$; Molds and Yeasts Count: $9,8 \times 10^3$ to $1,0 \times 10^4$ and $9,7 \times 10^3$ to $1,4 \times 10^4$; *Salmonella:* was detected in one of both salty and unsalty butter.

For whole powder milk and dehidrated skimmilk the countings were respectivily: Standard Plate Count: $9,2 \times 10^5$ to $1,1 \times 10^6$ and $3,2 \times 10^5$ to $8,6 \times 10^5$; No coliforms neither *Staphylococcus* were detected in both whole powder and dehidrated skimmilk ; Thermophilic Count: $3,2 \times 10^2$ to $6,1 \times 10^2$ and $5,0 \times 10^1$ to $1,1 \times 10^2$; Psychrotrophs (7ºC / 10 days and 21ºC / 25 hours) and Enterococci Counts: not found in all samples analysed ; Proteolytics Count: $1,6 \times 10^3$ to $1,9 \times 10^3$ and $9,5 \times 10^2$ to $1,3 \times 10^3$; Lipolytics Count: $6,0 \times 10^1$ to $2,3 \times 10^2$ and $5,0 \times 10^1$ to $1,6 \times 10^2$; Molds and Yeasts Count: $1,5 \times 10^2$ to $6,7 \times 10^2$ and none to $4,2 \times 10^1$; Aerobic spore forming Count: $5,0 \times 10^2$ to $6,3 \times 10^2$ and $5,5 \times 10^1$ to $1,7 \times 10^2$; *Salmonella* : all samples were negative for this organism.

The fairly high Total Counts, Coliforms, Fecal Coliforms, *Staphylococcus*, *S. aureus*, Enterococci, Proteolytics, Lipolytics, Psychrotrophs, in most samples of dairy products analysed in this work and the presence of *Salmonella* in some of them, reaveled that they should all be rejected for people consuming, once, most pathogenic microorganism countings are above thouse standards stablished by the Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.

On the other hand, these high microbial levels could be an indication of the poor hygienic conditions in the dairy plants and handling of these products at the retail level.

8 - LITERATURA CITADA

ADAMS, D. M. *et alii*, 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. J. Dairy Sci. 58: 828-834.

AMERICAN ASSOCIATION OF MEDICAL MILK COMISSIONS, 1960. Normas para el examen de los productos lacteos. Organización Panamericana de la Salud, 11ª ed., Washington, E.E.U.U. , p. 156.

AMERICAN DRY MILK INSTITUTE, 1973. Standards for grades of dry milks, including methods of analysis. Bulletin 916. Am. Dry Milk Inst. Inc., Chicago, IL.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, Inc., 1960. Standard Methods for the examination of dairy products. 11th ed. New York, N. Y.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1967. Standard methods for the examination of dairy products. 12th ed. New York, N. Y.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1972. Standard methods for the examination of dairy products. 13a ed. American Public Health Association, Inc., Washington, D.C., 345 p.

ANDERSON, J. A. e J. C. HARDENBERGH, 1932. Deterioration of cream by a lipolytic bacterium. J. Bacteriol. 23: 59.

ANDREY, J. Jr. e W. C. FRAZIER, 1959. Psychrophiles in milk held two days in farm bulk cooling tanks. J. Dairy Sci. 42: 1781-1784.

ANDREWS, R. H. e O. W. KAUFFMAN, 1953. The destruction of psychrophilic bacteria in milk by HTST pasteurization based on thermal death times studies. J. Dairy Sci. 36: 570-571.

ASHTON, T. R., 1950. Some bacteriological aspects of the deterioration of pasteurized milk. J. Dairy Res. 17: 261-287.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1970. Methods of analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53: 845-852.

BABEL, F. J., 1953. Activity of bacteria and enzymes in raw milk held at 4,4ºC. J. Dairy Sci. 36: 562.

BANWART, G. J., 1975. Laboratory exercices for food microbiology. The Ohio State University, Columbus, Ohio, 176 p.

BRYAN, F. L., 1973. Diseases transmitted by foods (A Classification and Summary). U. S. Depart. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, 63 p.

BUCHANAN, R. E. e N. E. GIBBONS, 1975. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, p. 292-295 , 298-317 , 484-485 and 504-505.

BERGDOLL, M. S., 1969. Bacterial toxins in food. Fd. Technol. Champaign, 23: 530-533.

BERGDOLL, M. S., 1970. Enterotoxins. In: T. C. Montie, S. Kadis, and S. J. Ajl. (ed.), Microbial Toxins. Vol. 3. Academic Press. New York and London.

BLADSAVLE, C. H. *et alii*, 1972. Isolation and identification of psychrophilic species of *Clostridium* from milk. Appl. Microbiol. 24: 699-702.

BRINDLEY, M., 1954. The surface microflora of stilton cheese normal and slip-coat. J. Dairy Res. 21: 83-100.

BRUM, M. A., 1974. Pesquisa dos agentes microbiológicos que mais frequentemente determinam alterações na manteiga durante a conservação. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 29 (172): 11-20.

BRUM, M. A. e MUSSOI, E., 1974. Aspêctos microbiológicos do leite pasteurizado consumido em Santa Maria, RS. II. Termodúricos, esporulados e germes termófilos. Revista do Centro de Ciências Rurais, 44: 383-388.

CHUNG, B. H. e R. Y. CANNON, 1971. Psychrotrophic spore-forming bacteria in raw milk supplies. J. Dairy Sci. 54: 448.

COLLINS-THOMPSON, D. L. *et alii*, 1977. Microbiological standards for cheese: survey and viewpoint of the Canadian Health Protection Branch. J. Food Protect. 40: 411-414.

COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS, 1978. Resolução aprovada pela CNNPA. Resolução nº 13/78. Diário Oficial da União, 25 de julho. p. 11.616-11.617.

COUSINS, C. M. *et alii*, 1977. The bacteriological quality of milk for cheddar cheese making. Dairy Ind. Int. 42: 12-17.

CROSSLEY, E. L. e W. A. JOHNSON, 1942. Bacteriological aspects of the manufacture of spray-dried milk and whey powders, including some observations concerning moisture content and solubility. J. Dairy Res. 13: 5.

DAVIS, P. A., 1951. The effect of cold on microorganisms in relation to dairying. Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 14: 216.

DELAY, P. D., 1947. The significance of the coliform test in pasteurized milk. J. Milk Food Technol. 10: 297-299.

DNHW, 1977. Food and Drugs Act and Food and Drug Regulations with Amendments to August 25, 1976. Dept. of National Health and Welfare, Minister of Supply and Services Canada, Ottawa.

DIFCO LABORATORIES, INC., 1957. Difco Manual of dehydrated culture media and reagents. 9th ed. Difco Laboratories, Inc. Detroit, Mich. p. 151.

DONNELLY, C. B. *et alii*, 1968. Production of enterotoxin A in milk. Appl. Microbiol. 16: 917-924.

EDDY, B. P., 1960. The use of the term psychrotrophic. J. Appl. Bacteriol. 23: 189-190.

EDWARDS, P. R. e M. M. GALTON, 1967. Samonellosis. Adv. Vet. Sci. 11: 1-63.

ELLIKER, P. R. *et alii*, 1964. Psychrophilic bacteria and Keeping quality of pasteurized dairy products. J. Milk Food Technol. 27: 69-75.

ERNSTROM, C. A., 1954. An early gas defect in pasteurized milk cheddar cheese. Milk Prod. J. 45: 21-42.

FAGERBERG, D. J. e J. S. AVENS, 1976. Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food. A Review. J. Milk Food Technol. 39: 628-646.

FANTASIA, L. D. *et alii*, 1975. Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. Appl. Microbiol. 29: 179-185.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1972. Bacteriological analytical manual. 3rd ed. U. S. Dept. of Health, Education and Welfare, Washington, D. C.

FORD, H. F. e F. J. BABEL, 1969. Milk quality problems associated with present day marketing. J. Milk Food Technol. 22: 141-144.

FOSTER, E. M. *et alii*, 1957. Dairy Microbiology. p. 38-43 e 136-141.

FOX, C. W. *et alii*, 1976. Incidence and identification of phospholipase C - producing bacteria in fresh and spoiled homogenized milk. J. Dairy Sci. 59: 1.857-1.864.

FRANK, J.P. e E.H. MARTH, 1978. Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* . J. Food. Protect. 41: 198-200.

FRANK, J. F. *et alii*, 1977. Survival of enteropathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of camembert cheese. J. Food Protect. 40: 835-842.

FRANK, J. F. *et alii*, 1978. Behavior of enteropathogenic *Escherichia coli* during the manufacture and ripening of brick cheese. J. Food Protect. 41: 111-115.

FRANKLIN, J. G. e M. E. SHARPE, 1963. The incidence of bacteria in cheese milk and cheddar cheese and their association with flavour. J. Dairy Res. 30: 87-99.

FRYER, T. F. e M. E. SHARPE, 1965. A termoduric strain of *Streptomyces albus* isolated from cheddar cheese. J. Dairy Res. 32: 27-34.

GALTON, M. M. *et alii*, 1968. Salmonellae in foods and feeds. Review of isolation methods and recommended procedures. U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare / Public Health Service. Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia .

GIBSON, T. e ABD-EL-MALLECK, Y., 1957. The development of bacterial populations in milk. Canadian J. Microbiol. 3: 203-213.

GOEPFERT, J. M. *et alii*, 1968. Behavior of *Salmonella typhimurium* during manufacture and curing of cheddar cheese. Appl. Microbiol. 16: 862-866.

GOLDONI *et alii*, 1977. Congresso Nacional de Laticínios, 4º, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora, EPAMIG, Inst. Latic. Candido Tostes, p. 144-149.

GROSSKOPF, J. C. e W. J. HARPER, 1969. Role of psychrophilic sporeformers in long-life milk. J. Dairy Sci. 52: 897.

HAMMER, B. W. e M. A. COLLINS, 1934. The numbers of lipolytic bacteria in various dairy products, as determined with nile-blue sulfate. Res. Bull. Ia. Agric. Exp. Sta. nº 169.

HARGROVE, R. E. *et alii*, 1971. A seletive medium and presumptive procedure for detection of *Salmonella* in dairy products. J. Milk Food Technol. 34: 6-12.

HARLAND, H. A. *et alii*, 1952. The effect of the various steps in the manufacture on the extent of serum protein denaturation in nonfact dry milk solids. J. Dairy Sci. 35: 363.

HEINEMANN, B., 1957. Growth and thermal destruction of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* in heated and raw milk. J. Dairy Sci. 40: 1.585-1.589.

HENDRICKS, S. L. *et alii*, 1959. Staphylococcal food intoxication due to cheddar cheese. J. Milk and Food Technol. 22: 313-317.

HOBBS, B. C. e J. GILBERT, 1974. Microbiological counts in relation to food poisoning. Proc. IV Int. Congress Food Sci. and Technol. III: 159-169.

HOUSE COMMITTEE ON INTERSTATE AND FOREIGN COMMERCE AND THE SENATE COMMITTEE ON LABOR AND PUBLIC WELFARE, 1973. Compilation of selected public health laws (Join Committee print, 93rd Congress, 1st session). Vol. 2, Federal Food, Drug and Cosmetics Act. U.S. Government Printing Office, Washington.

JAWETZ, E. *et alii*, 1970. Microbiologia Médica. 2ª ed. Rio de Janeiro, Edit. Guanabara, p. 175-177.

JENSEN, J. P. *et alii*, 1975. Role of enterococci in cheddar cheese: Growth of enterococci during manufacturing and curing. J. Milk Food Technol. 36: 613-618.

JONES, F. T. e B. E. LANGLOIS, 1977. Microflora of retail fluid milk products. J. Food Protect. 40: 693-697.

JONES, G. A. *et alii*, 1967. Coliform bacteria in Canadian pasteurized dairy products. Can. J. Public Health 58: 257-264.

JUFFS, H. S. e F. J. BABEL, 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. J. Dairy Sci. 58: 1.612-1.619.

KEOGH, B. P., 1971. Reviews of the progress of dairy science. J. Dairy Res. 38: 91-111.

KILBOURNE, 1920. Ninth Ann. Rept., Interntl. Assoc. Dairy and Milk Insp. 111 (Cited in Tanner, F. W., 1944). "The Microbiology of Food". Champaign, Illinois, Garrard Press, 321 p.

KIURU, Von K. *et alii*, 1971. Die proteolytische aktivitat der psychrotrophen mikroorganismen in der holbehaltermilch. Milchwissenschaft 26: 138.

KOSIKOWSKI, F., 1970. Cheese and fermented milk foods. Michigan, Edwards Brothers, p. 356.

LAW, B. A. *et alii*, 1976. The effect of lipolytic gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in cheddar cheese. J. Dairy Res. 43: 459-468.

LUCK, H., 1972. Bacteriological quality tests for bulk-cooled milk. A review. Dairy Sci. Abst. 34: 101-122.

MARKUS, Z. e G. J. SILVERMAN, 1968. Enterotoxin B production by nongrowing cells of *Staphylococcus aureus* . J. Bacteriol. 96: 1.446-1.447.

MARIER, R. *et alii*, 1973. An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. Lancet 2: 1.376-1.378.

MARTH, E. H. e W. C. FRAZIER, 1957. Bacteriology of milk held at farm bulk cooling tank temperatures. III. Psychrophiles found and their growth. J. Milk Food Technol. 20: 93-99.

MAYERHOFER, H. J. *et alii*, 1973. Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P 26 . Appl. Microbiol. 25: 44-48.

MEHLMAN, I. J. *et alii*, 1974. Problems in the recovery and identification of enteropathogenic *Escherichia coli* from food. J. Milk Food Technol. 37: 350-356.

MEHLMAN, I. J. *et alii*, 1976. Pathogenicity of *Escherichia coli* recovered from food. J. Ass. Off. Anal. Chem. 59: 67-80.

MICKELSON, R. *et alii*, 1967. Some chemical and flavour characteristics of a milk proteolysate of *Pseudomonas fluorescens*. J. Dairy Sci. 50: 172-176.

MINOR, T. E. e E. H. MARTH, 1972. *S. aureus* and Staphylococcal food intoxications. A Review. The Staphylococci: characteristics, isolation and behavior in artificial media. J. Milk Food Technol. 34: 557.

MORENO, V. e F. V. KOSIKOWSKI, 1973. Peptides, amino-acids and amines liberated from β-casein by micrococcal cell-free preparations. J. Dairy Sci. 56: 39.

MORSE, P. M. *et alii*, 1968. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk. III. Increase in count, from cow to bulk tank and effects of refrigerated storage and preliminary incubation. J. Dairy Sci. 51: 1.192-1.206.

MORSE, S. A. *et alii*, 1969. Regulation of Staphylococcal enterotoxin B. J. Bacteriol. 98: 4-9.

MOUREY, A. e G. KILBERTUS, 1976. Simple media containing tributirin for demonstrating lipolytic bacteria in food and soils. J. Appl. Bacteriol. 40: 47-51.

MUSSOI, E., 1974. Aspectos microbiológicos da flora contaminante de queijos tipo Prato e Lanche. Boletim do Leite, 552: 21-24.

NAGUIB, K. H. *et alii*, 1972. Spray dried milk of the sakha plant. II. Identification of predominating microorganisms. J. Milk Food Technol. 35: 45.

NASHIF, S. A. e F. E. NELSON, 1953. The lipase of *Pseudomonas fragi*. I. Characterization of the enzyme. J. Dairy Sci. 36: 459-470.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1971. Reference methods for the microbiological examination of foods. Food Protection Committee, Food and Nutrition Board, Division of Biology and Agriculture, National Research Council.

NATIONAL CENTER FOR DISEASE CONTROL. 1970. Staphylococcal food poisoning traced to butter - Alabama. Morbidity Mortality 19: 271.

OLIVERIA, J. S. e C. E. PARMELEE, 1976. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. J. Milk Food Technol. 39: 269-272.

OVERCAST, W. W. e K. ATMARAM, 1974. The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk. J. Milk Food Technol. 37: 233-236.

OVERCAST, W. W. e J. D. SKEAN, 1959. Growth of certain lipolytic microorganisms at 4ºC and their influence on free fat acidity and flavour of pasteurized milk. J. Dairy Sci. 42: 1.479-1.485.

PATEL, G. B. e G. BLANKENAGEL, 1972. Bacterial count of raw milk, and flavour of the milk after pasteurization and storage. J. Milk Food Technol. 35: 203.

PEDERSON, C. S. e M. W. YALE, 1934. Effect of temperature of incubation upon agar plate count of milk. Am. J. Public Health 27: 477-484.

PINHEIRO, A. J. *et alii*, 1965. Heat stability of lipases of selected psychrophilic bacteria in milk and purdue swiss-type cheese. J. Dairy Sci. 48: 983-984.

POZNANSKY, S. *et alii*, 1965. La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. Le Lait 45: 3-26.

PURSCHEL, M. e C. POLLACK, 1972. Proteolytischer Abbau der Micheiweiss - Stoffe durch Bakterien. 2. Mitt. Die Wircung von psychrophilen and milch - saurebildenden bakte - rien auf die Eiweisstoffe in der Milch. Die Nahrung. 16: 451.

RAYMAN, M. K. *et alii*, 1975. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as a mean of identifying *S. aureus*. Appl. Microbiol. 29: 451-454.

READ, R. B. *et alii*, 1963. Assay of Staphylococcal enterotoxin in milk by immunodifusion. J. Dairy Sci. 46: 598-599.

REITER, B., 1964. Factors affecting the multiplication and survival of coagulase positive Staphylococci in cheddar cheese. J. Dairy Res. 31: 261-272.

ROGERS, 1915. Cream and Milk Plant Mthly 4: 15 (Cited in Tanner, F. W., 1944. "The Microbiology of Food". Champaign, Illinois, Garrard Press, 321 p.

ROGICK, F. A. e L. H. BURGWALD, 1952. Some factors which contribute to the psychrophilic count in raw milk. J. Milk Food Technol. 15: 181-195.

RYDER, R. W. *et alii*, 1976. Infantile diarrhea produced by heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli*. New Eng. J. Med. 295: 849-853.

SACK, R. B., 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol. 28: 333-353.

SAMUELSSON, E. G. e S. HOLM, 1966. Technological principles for ultrahigh heat treatment of milk. XVII Int. Dairy Congr. , Munchen, B. 1. 57.

SCOTT, W. J., 1953. Water relations of *S. aureus* at 30ºC. Aust. J. Biol. Sci. 6: 549-563.

SHAHANI, K. M., 1974. Lipases and esterases. Page 181 in Enzymes in Food Processing. G. Reed, ed. Academic Press, New York.

SHARF, J. M., 1972. Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos. Tradução de M. Falcone, São Paulo, Polígono, p. 187-212.

SHARPE, M. E. *et alii*, 1962. Staphylococci and micrococci associated with dairying. J. Appl. Bacteriol. 25: 403-415.

SPERBER, W. H. e S. R. TATINI, 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *S. aureus*. Appl. Microbiol. 29: 502-505.

STANIER, R. Y. *et alii*, 1969. Mundo dos Micróbios. Ed. Edgard Blucher Ltda, SP. - Brasil, p. 334-354.

TAKAHASHI, I. e C. K. JOHNS, 1959. *Staphylococcus aureus* in cheddar cheese. J. Dairy Sci. 42: 1.032-1.037.

THOMAS, S. B., 1958. Microrganisms in milk and dairy products. Part II. Dairy Sci. Abstrs. 20: 447.

THOMAS, S. B. e R. G. DRUCE, 1969. Psychrotrophic bacteria in refrigerated pasteurized milk. A Review. Dairy Ind. 34: 351.

THOMAS, S. B. e C. V. SEKHAR, 1946. Phychrophilic bacteria in raw and commercially pasteurized milk. Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 1: 47.

THOMAS, S. B. *et alii*, 1966. The significance of psychrotrophic bacteria in raw milk. Dairy Ind. 31: 27-32.

THOMSON, G. I., 1950. Coliform bacteria in New Zealand butter. J. Dairy Res. 17: 72-78.

THOMPSON, S. S. *et alii*, 1978. Survival of selected organisms during spray drying of skim milk and storage of nonfat dry milk. J. Food Protect. 41: 16-19.

TINUOYE, O. L. e L. G. HARMON, 1975. Growth of thermoduric psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. Am. Dairy Rev. 37: 26-30.

TROLLER, J. A., 1976. Staphylococcal growth and enterotoxin production factors for control. J. Milk Food Technol. 39: 499-503.

VAN der ZANT, W. C. e F. E. NELSON, 1953. Characteristics of an endocellular proteolytic enzume system of *Streptococcus lactis*. J. Dairy Sci. 36: 1.212-1.222.

WASHAM, C. J. *et alii*, 1977. Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. J. Food Protect. 40: 101-108.

WATROUS, G. H. *et alii*, 1971. A survey of the actual and potential bacterial keeping quality of pasteurized milk from 50 Pennsylvania dairy plants. J. Milk Food Technol. 34: 145.

WEICKBACH, L. S. e B. E. LANGLOIS, 1977. Effect of heat treatments on survival and growth of a psychrotroph and on nitrogen fractions in milk. J. Food Protect. 40: 857-862.

WITTER, L. D., 1961. Psychrophilic bacteria. A Review. J. Dairy Sci. 44: 983-1.015.

YALE, M. W., 1943. Significance of the coliform group of bacteria in American cheddar cheese. J. Dairy Sci. 26: 766. (Abstr.).

YANAGIYA, T. *et alii*, 1973. Changes of milk protein by psychrotrophic organisms. J. Agr. Chem. Soc. Jap. 47: 259.