

MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM LEITES SUBMETIDOS À ULTRA ALTA TEMPERATURA ADQUIRIDOS EM CURITIBA, PARANÁ

PSYCHROTROPHIC BACTERIA IN ULTRA-HIGH-TEMPERATURE MILK ACQUIRED IN CURITIBA, PARANÁ

E. S. SOUZA¹, D. R. ROSA², J. A. GALVÃO^{3,4}

RESUMO

O tratamento do leite em ultra alta temperatura (UAT) possibilita a eliminação de patógenos e aumento do tempo de prateleira, no entanto, bactérias psicotróficas são associadas a efeitos negativos no produto, como lipólise, rancificação e a geleificação. Resultado da resistência de alguns esporos ao processamento, e à possível atividade residual de enzimas termorresistentes. Assim, o objetivo deste estudo foi enumerar bactérias psicotróficas e realizar a prova de lactofermentação em leites UAT comercializados na região de Curitiba, Paraná. Foram adquiridas 60 amostras de duas marcas (30 da marca A e 30 da marca B) quinzenalmente em três diferentes momentos. Em cada momento 10 amostras de um mesmo lote eram separadas em dois grupos (D0 e D7), sendo D0: cinco amostras avaliadas no dia da compra, e D7: cinco amostras avaliadas após incubação a 37± 1°C/7 dias e analisadas quanto à enumeração de bactérias psicotróficas, coloração de Gram e prova da lactofermentação. Em D0, uma (3,4%) amostra (marca A) apresentou crescimento de psicotróficos (2,50 x 10⁵ UFC/mL), Gram negativos. As amostras da marca B não apresentaram crescimento microbiano. Vinte e cinco (83,3%) amostras não formaram coágulo, e cinco (16,7%) produziram coágulo esponjoso. Em D7, nenhuma amostra apresentou contagem bacteriana, 20 (66,7%) não produziram coágulo e 10 (33,3%) produziram coágulo esponjoso. O processo UAT utilizado pela marca A não garantiu efetividade na redução de bactérias psicotróficas, e o resultado do teste de lactofermentação indica a possível contaminação por coliformes em ambas as marcas. Ainda, a ausência de coágulos em diversas amostras pode ser um indicativo do uso de conservantes, o que é considerado fraude.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminação. Qualidade microbiológica. Refrigeração.

SUMMARY

The beneficial effects of ultra-pasteurization milk treatment include elimination of milk pathogens, besides increasing the product's shelf-life, however, psychrotrophic bacteria are associated with several negative effects in the final product such as lipolysis, rancidification and gelation. This results from heat-resistant spores and its possible residual extracellular heat-resistant enzymes activity. With that in mind, this paper aimed to quantify psychrotrophic bacteria and perform a milk clotting test in UHT milk sold in Curitiba, Paraná. 60 samples from two brands were acquired (30 from A brand and 30 from B brand) each 15 days in different moments. Each time, 10 samples from a same batch were separated in two groups (D0 and D7), being D0: five samples analyzed in the purchase day, and D7: five samples analyzed after incubation at 37± 1°C/7 days and evaluated regarding enumeration of psychrotrophic bacteria, Gram staining and milk clotting test. The heat-treating process effectiveness was evaluated by analyzing 30 samples from each brand, A and B, totalizing 60, being 10 from each different production batches, through the surface inoculation method in PCA, milk clotting test and classification of the isolated colonies by the Gram method. In D0, one (3,4%) sample (from A brand) resulted in Gram negative psychrotrophic growing (2,50 x 10⁵ UFC/mL). Samples from B brand did not result in bacterial growth. 25 samples (83,3%) did not clot, and five (16,7%) produced sponge clots. In D7, none of the samples presented bacterial growth, 20 (66,7%) did not clot and 10 (33,3%) produced sponge clots. Mesophilic bacterial culture was not done. The A brand UHT process did not grant sterilization regarding psychrotrophic bacteria, and the milk clotting results indicate possible coliforms contamination in both brands. Furthermore, clot absence in several samples could indicate preservatives usage, which is considered fraud.

KEY-WORDS: Contamination. Microbiologic quality. Refrigeration.

¹ Departamento de Medicina Veterinária. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

² Departamento de Zootecnia. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

³ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Departamento de Medicina Veterinária. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

⁴ Autor correspondente: julia.galvao@ufpr.br

INTRODUÇÃO

A refrigeração do leite cru é eficaz no controle da multiplicação de bactérias classificadas como mesófilas quando realizada corretamente (DAS et al., 2015 e PALUDETTI et al., 2018). Contudo, bactérias psicrotróficas são capazes de se multiplicar em baixas temperaturas (OLIVEIRA et al., 2015).

O processo conhecido como *Ultra High Temperature*, UAT, ou ultrapasteurização, tem como objetivo garantir a esterilidade comercial do leite, destruindo a totalidade dos patógenos presentes por meio da utilização do binômio tempo/temperatura 130°C a 150°C por 2 a 4 segundos, seguido de resfriamento a menos de 32°C e envase em condições assépticas (BRASIL, 2020 e NERO et al., 2017). Contudo, esporos de bactérias, como as psicrotróficas e clostrídios, são capazes de resistir ao processo, posteriormente se multiplicando e produzindo enzimas termotolerantes. Esse é um dos principais meios pelo qual esses microrganismos causam diversos problemas como sabores indesejáveis no leite, instabilidade físico-química, entre outros devido a ação de peptidases e lipases. (MACHADO et al., 2017).

A permanência dessas enzimas, apesar da redução da carga microbiana pelo processo de temperatura, é um fator limitante da qualidade do leite e derivados. Essas peptidases e lipases são enzimas hidrolíticas, que agem hidrolisando componentes importantes do alimento, tais como proteínas e lipídeos (RIBEIRO JUNIOR et al., 2018). Uma das proteínas que podem ser hidrolisadas nesse processo é a caseína. Sua quebra contribui para a desestabilização do leite e para a ocorrência de sedimentação durante o armazenamento (MATÉOS et al., 2015), considerados defeitos de fabricação.

A Instrução Normativa 77/2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece medidas para o controle de microrganismos mesófilos, como a refrigeração do leite a 4°C, na utilização do tanque de expansão direta, e o seu armazenamento nele por no máximo três horas. Entretanto, não existem normas no Brasil que determinem limites para contagens de psicrotróficos, ou instruções para seu controle. É sabido que mesófilos são microrganismos indicadores importantes para parâmetros higiênicos-sanitários na produção, mas a pesquisa de psicrotróficos também são indicadores de qualidade. A presença exacerbada dessas bactérias pode significar condições higiênicas insatisfatórias, uso impróprio da refrigeração nos produtos, entre outros (SANTOS, 2010).

A 10°C, o crescimento médio de psicrotróficos pode ser até quatro vezes maior do que a 4°C (SANTOS, 2010). Ou seja, para um controle efetivo do crescimento desses microrganismos, a refrigeração tem que ser feita de forma correta e sistemática, o que nem sempre é a realidade em propriedades, no transporte do leite ou até mesmo na indústria, apesar de tamanha importância.

MOREIRA et al. (2013) verificaram a produção de proteases por 73% de 40 isolados psicrotróficos realizados a partir de leite cru refrigerado. Tais enzimas

favorecem a lipólise e a proteólise, com posterior desenvolvimento de sabor amargo e de ranço no produto desses locais. Consequentemente, isso acarreta perdas financeiras significativas. Entretanto, é necessário enfatizar que a refrigeração não corrige falhas de higiene durante a ordenha.

A prova da lactofermentação tem como objetivo verificar o tipo de microbiota predominante no leite, se presente, baseado no aspecto, odor e tipo de coágulo formado. Entretanto, a ausência de coagulação também pode ser indicadora de características importantes, como possível presença de agentes antimicrobianos residuais no alimento. Em especial, amostras com coágulos de aspecto digerido sugerem a presença de microrganismos que produzem enzimas proteolíticas, como algumas espécies de psicrotróficos (PINTO et al., 2006), tornando-se uma ferramenta valiosa, apesar de não oficial, para detectar a presença dessas bactérias sem necessidade de cultura por um longo período.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo enumerar bactérias psicrotróficas e realizar a prova de lactofermentação em leites UAT comercializados na região de Curitiba, Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas amostras de leite integral UAT no comércio varejista de Curitiba, PR e região. Duas marcas (identificadas como A e B) que frequentemente estão disponíveis foram selecionadas, consideradas amostras de ocasião. As aquisições ocorreram quinzenalmente em três momentos distintos. A cada aquisição 10 unidades do mesmo lote eram testadas, totalizando 60 amostras. Das 10 amostras adquiridas na quinzena, cinco unidades foram processadas no dia da compra (D0), e as outras cinco foram processadas após pré-incubação a 36°C ± 1°C por 7 dias (D7).

O processamento das amostras iniciou com a higienização das embalagens, com água e detergente, seguida de secagem e aplicação de álcool 70%. A segunda etapa consistiu em submeter o leite à contagem de microrganismos psicrotróficos. Para isso, foram preparadas diluições em NaCl 0,85%. Em seguida, foi realizada a sementeira de 1 mL da diluição em superfície em Ágar não-seletivo *Plate Count Agar* (PCA) em placas de Petri. Após a sementeira, as placas foram incubadas por 10 dias a 7±1°C, seguida de contagem total das colônias (SWANSON et al., 2001). Os resultados foram expressos em número de Unidades Formadoras de Colônia por mL de leite diluído semeado em cada placa. Em seguida, duas colônias de cada placa foram submetidas à coloração de Gram, e identificação morfológica em microscopia óptica.

Adicionalmente, para verificar a presença da atividade residual de proteases, e caracterizar a microbiota presente no leite, foi realizada a prova de lactofermentação para cada uma das 60 amostras, para tanto, 10 mL de cada amostra foram adicionados em tubos de ensaio estéreis com tampa de rosca, que foram incubados a 36-37°C, com leituras após 24, 48, 72 e 96 horas (PINTO et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 15 amostras analisadas em D0 da marca A, uma (7,7%) apresentou contagem com resultado detectável de psicrotróficos ($\geq 2,50 \times 10^5$ UFC/mL). As demais analisadas em D7 da mesma marca apresentaram placas sem contagem, ou seja $\leq 1,0 \times 10^2$ UFC/mL, que é o limite de detecção da técnica utilizada nesse estudo. Quanto às amostras da marca B, nenhuma apresentou contagem nas placas ($\leq 1,0 \times 10^2$ UFC/mL).

É sabido que a presença de bactérias deteriorantes no leite UAT é indicativa de condições higiênicas-sanitárias inadequadas na cadeia produtiva, principalmente na ordenha (uso de leite cru de baixa qualidade, ou falta de Boas Práticas de Ordenha), no sistema de envase e nos equipamentos de tratamento térmico (WESTHOFF; DOUGHERTY, 1981). Entretanto, tendo em vista que a amostra com crescimento bacteriano não foi pré-incubada, e nenhuma das pré-incubadas apresentou contagem $\geq 1,0 \times 10^0$ UFC/mL, existe a possibilidade dessa única amostra ter sofrido contaminação externa durante o seu processamento no laboratório.

Quanto às 30 amostras da marca B (tanto as analisadas em D0, quanto em D7), nenhuma apresentou contagem detectável. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por SAEKI EK e MATSUMOTO LS (2010) e ROSSI JÚNIOR et al. (2006), que também demonstraram a eficácia do processo UAT no controle da multiplicação de bactérias psicrotróficas.

Esses parâmetros expressam garantia da qualidade dos produtos avaliados, indicando eficiência no processo UAT, na higiene geral da cadeia produtiva e de uso de matéria prima adequada. Tais resultados podem ser atingidos por qualquer indústria de laticínios por meio da adoção de boas práticas de ordenha e refrigeração adequada do leite cru. Sabe-se que a presença de bactérias psicrotróficas, como a *Pseudomonas* spp., pode afetar negativamente o processamento térmico de derivados lácteos, portanto, boas práticas higiênicas podem contribuir diretamente para a melhoria da qualidade desses produtos (VIDAL et al., 2017).

VIDAL et al. (2017), procurando as principais fontes de contaminação por bactérias psicrotróficas em tanques de expansão de dez fazendas leiteiras, verificaram que a má higienização da mão de ordenhadores, da superfície dos tetos das vacas, das teteiras e dos tanques de resfriamento são as principais causas da presença das bactérias no leite cru. O resfriamento do leite não é garantia de boa qualidade. O primeiro ponto de controle é garantir que o leite cru seja coletado sob condições sanitárias adequadas e que minimizem a contaminação (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2014). Outro fator de risco importante inerente à presença desses microrganismos no leite é a formação de biofilme por bactérias do gênero *Pseudomonas* (MANN e WOZNIK, 2012), que são comunidades bacterianas envolvidas por uma matriz de polissacarídeos, conferindo alta resistência e persistência a métodos de controle de contaminação.

Quanto aos resultados observados na coloração de Gram, a única amostra com contagem $\geq 1,0 \times 10^0$

UFC/mL foi isolada e analisada, apresentando bactérias baciliformes Gram-negativas. Esse resultado está de acordo com estudos apresentados por STEPANIAK (1997), que sugere que a grande maioria dos contaminantes psicrotróficos do leite sejam Gram-negativas.

As amostras submetidas ao teste da lactofermentação no momento D0 não apresentaram coágulo, representando 25 amostras (83,4% do total analisado), o que pode indicar a ausência de células microbianas por alta eficiência do processo UAT, ou a presença de agentes conservantes que impedem a multiplicação bacteriana (PINTO et al., 2006). Por outro lado, o processo também fez com que nenhuma das amostras apresentasse coágulos uniformes, ou gelatinosos, o que indicaria a presença de bactérias ácido-láticas (BAL). Essas bactérias fazem parte da microbiota ideal do leite-cru, e são desejáveis por estarem relacionadas a efeitos benéficos como ação probiótica e regulação do trânsito intestinal (BELOTI, 2015). Os outros 16,6% das amostras apresentaram coágulo do tipo esponjoso, sugerindo contaminação por microrganismos do grupo dos coliformes (SANTANA, 2016). Nenhuma das amostras apresentou coágulo do tipo digerido, característico de microrganismos psicrotróficos proteolíticos (SANTANA, 2016), em concordância com a baixa contagem bacteriana nas placas analisadas.

As amostras analisadas no momento D7 apresentaram resultados semelhantes, sendo a maioria dos resultados sem coagulação, mas com o dobro de amostras com coágulo esponjoso (10, sendo 7 da marca A e 3 da marca B, representando 33,3% do total), também com ausência de coágulos do tipo digerido e gelatinoso. No teste realizado sem incubação, cinco amostras da marca A apresentaram coágulo do tipo esponjoso.

Os coágulos de tipo esponjoso caracterizam a presença de microrganismos do grupo dos coliformes (SANTANA et al., 2016), que, através da produção de gases oriundos do seu metabolismo, formam orifícios no leite coagulado. Essas bactérias não são desejáveis no leite cru, muito menos no leite processado. Como descrito por PEREIRA et al. (2013), por se tratar de produtos UAT, é provável que a origem dessa contaminação tenha acontecido pós-processo térmico, caracterizando falhas no final da produção. Porém, também podem ser provenientes de más condições higiênicas ao longo da cadeia de produção (ordenha, estocagem e transporte), podendo atingir o produto por meio de contaminação cruzada.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, o processo UAT utilizado por ambas as marcas não demonstrou completa eficiência no controle de bactérias psicrotróficas, já que houve uma amostra com crescimento bacteriano detectável, o que não é esperado de um produto que deveria ser comercialmente estéril. Em adição, os testes de lactofermentação revelam a provável contaminação por microrganismos mesófilos do grupo dos coliformes em até um terço das amostras analisadas em D7. Não

houve formação de coágulos gelatinosos em nenhum dos produtos, indicando a ausência de bactérias ácido-láticas.

Portanto, apesar do processo UAT ser efetivo contra bactérias psicrotróficas, a indústria de laticínios pode desprender de medidas para evitar a presença de outros microrganismos contaminantes (coliformes, como sugerido pela prova de lactofermentação), investindo em boas práticas de fabricação, higienização correta dos equipamentos utilizados e identificando possíveis pontos de contaminação dentro do processo de produção.

REFERÊNCIAS

- BALIGNIÈRE, F.; MATÉOS, A.; TANGUY, G.; JARDIN, J.; BRIARD-BION, V.; ROUSSEAU, F.; ROBERT, B.; BEAUCHER, E.; GAILLARD, J. L.; AMIEL, C.; HUMBERT, G.; DARY, A.; GAUCHERON, F. Proteolysis of ultra-high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilization. **International Dairy Journal**, v.31, n.2, p.55-61, 2013.
- BAUR, C.; KREWINKEL, M.; KRANZ B.; VON NEUBECK, M.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v.49, p.23-29, 2015.
- BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Nº 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 10, 30 nov. de 2018.
- BRASIL. Decreto Nº10.468, de 18 de agosto de 2020. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 5, 19 de agosto de 2020.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Produção de Leite e Sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**. Belo Horizonte: FEPMVZ - EDITORA, 2001.
- CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFU, A. A.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.1-30, 1994.
- DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Blucher, 2017.
- DAS, S.; SIVARAMAKRISHNA, M.; BISWAS, K.; GOSWAMI, B. A low-cost instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. **ISA Transactions**, v.56, p.268-275, 2015.
- HASAN, F et al. 2006. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbiology Technology** 39: 235–251.
- MACHADO, S. G.; BALIGNIÈRE, F.; MARCHAND, S.; COILLIE, E. V.; VANETTI, M. C. D.; BLOCK, J. D.; HEYNDRIKX, M. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-22, 2017.
- MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. Pseudomonas Biofilm Matrix Composition and Niche Biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.4, p.893-916, 2012.
- MATÉOS, A.; GUYARD-NICODÈME, M.; BALIGNIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; DARY, A.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v.49, p.78-88, 2015.
- MOREIRA, G. I. P.; LINHARES, D. P.; PADOVANI, T. R.; MARTINS, M. L. Determinação de bactérias mesófilas e psicrotróficas em leite cru refrigerado e avaliação do perfil proteolítico de isolados psicrotróficos. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 27, 2013, Natal. **Resumos [...]**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2013. p.1826.
- NERO, L. A.; CRUZ, A. G.; BERSOT, L. S. **Produção, processamento e fiscalização de leite e derivados**. São Paulo: Ateneu, 2017.
- OLIVEIRA, G. B.; FAVARIN, L.; LUCHESE, R.; MCINTOSH, D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.2, p.313-321. 2015.
- PALUDETTI, L. F.; KELLY, A. L.; O'BRIEN, B.; JORDAN, K.; GLEESON, D. The effect of different precooling rates and cold storage on milk microbiological quality and composition. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.3, p.1921-1929. 2018.
- PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; RIOS, E. A.; OLIVEIRA, V. H. S.; YAMAMURA, A. A. M.; BELOTI, V. Microbiota Mesófila Aeróbia Contaminante do Leite UHT. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v.68, n.394, p.25-31, 2013.

- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicotróficas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.645-651, 2006.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; SHECAIRA, C. L.; SILVA, F. F.; PARREN, G. E.; BELOTI, V. Influência de Boas Práticas de Higiene de ordenha na qualidade microbiológica do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.69, n.6, p.395-404.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C. **Micro-organismos deteriorantes do leite:** atividade proteolítica e lipolítica de bactérias psicotróficas e termofílicas mesófilas. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.
- ROSSI JÚNIOR, O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; CORTEZ, A. L. L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.27-32, 2006.
- SAEKI, E. K.; MATSUMOTO, L. S. Contagem de Mesófilos e Psicotróficos em Amostras de Leite Pasteurizado e UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 377, p. 29-35, 2010.
- SANTANA, E. H. W.; FAGNANI, R.; SOUZA, C. H. B. **Análises físico-químicas aplicadas no controle de qualidade do Leite Cru**. Londrina: UNOPAR Editora, 2016.
- SANTOS, J. M. **Leite cru refrigerado:** características físico-químicas, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicotróficos. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.
- SWANSON, K. M. J.; PETRAN; HANLIN, J. H. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA, 2001.
- SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.2, p.35-41, 1997.
- VIDAL, A. M. C.; NETTO, A. S.; VAZ, A. C. N.; CAPODIFÓGLIO, E.; GONÇALVES, A. C. S.; ROSSI, G. A. M.; FIGUEIRERO, A. S.; RUIZ, V. L. A. *Pseudomonas* spp.: contamination sources in bulk tanks of dairy farms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.9, 2017.
- WESTHOFF, D.C.; DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.572-578, 1981.