

INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA CONTAGEM DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS EM LEITE E DERIVADOS FLUIDOS PASTEURIZADOS*

Dilson Teixeira Coelho
Elizete Blunck Bragança Coelho**

1. INTRODUÇÃO

Em consequência do desenvolvimento tecnológico observado nos últimos anos, como o aparecimento de facilidades para refrigeração, transporte do leite a distância maiores ou armazenamento do leite por períodos mais longos, o crescimento e a atividade das bactérias psicrotróficas são tidos como fundamentais no controle da qualidade do leite pasteurizado.

As bactérias psicrotróficas crescem com relativa rapidez em leite estocado a temperaturas em torno de 7°C, constituindo, assim, o principal problema para o armazenamento de leite.

Esses microrganismos foram primeiramente denominados Psicrotróficos por EDDY (4), MOSSEL e ZWART (8), em 1960, em substituição ao termo Psicrófilos, dado por Schmidt-Nielsen, em 1902, e amplamente empregado até os dias atuais. A nova terminologia define melhor esses microrganismos, que, embora sejam capazes de crescer em baixa temperatura, têm nas temperaturas médias, entre 20 e 30°C, seu ótimo de desenvolvimento (15).

À medida que a qualidade do leite é aprimorada, a flora bacteriana é alterada, e os padrões bacteriológicos previamente estabelecidos passam a significar muito pouco em relação à vida útil do leite pasteurizado. A contagem total pelo método-padrão de placas e a contagem de coliformes têm sido de pouco valor para predizer a vida útil do leite pasteurizado (2, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15).

WITTHER (16), numa vasta revisão, constatou que a contagem de psicrotróficos não tinha nenhum valor para estimar ou prever a vida útil do leite pasteurizado em condições normais de armazenamento.

* Recebido para publicação em 17-02-1978.

** Respectivamente, Prof. Adjunto e Auxiliar de Ensino da Universidade Federal de Viçosa.

Provavelmente, algumas bactérias psicrotróficas capazes de crescer e causar alterações no leite pasteurizado a baixas temperaturas (2 a 7°C) nem sempre conseguem desenvolver-se em ágar-padrão e produzir colônias na contagem de psicrotróficos. Esta poderia ser uma das razões por que a contagem-padrão de psicrotróficos para leite pasteurizado não é bom indicativo da sua vida útil nas temperaturas de refrigeração comercial usuais.

HEATHER e VAN DER ZANT (6, 7) observaram que bactérias psicrotróficas sobreviventes de tratamento térmico não são capazes de crescer em placas com ágar-triptona-glicose-extrato de levedura, como se usa habitualmente, embora cresçam no referido ágar antes do tratamento térmico. Durante as operações de limpeza e sanitização nos laticínios, usa-se água quente, porém, isso não resulta em esterilização completa dos equipamentos e, provavelmente, a maioria dos psicrotróficos que viriam a contaminar o produto teria, então, sofrido choque térmico.

Visando à enumeração dessas bactérias que sofreram choque térmico, é preciso considerar um requerimento de condições diferentes de meio, a fim de que reassem o crescimento, o que não acontece com células normais das mesmas bactérias (3, 6, 7).

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade de utilização de diferentes meios de cultura na determinação quantitativa de bactérias psicrotróficas e testar a significação do uso do ágar-padrão, em comparação aos outros meios, na contagem de psicrotróficos em leite e derivados fluidos pasteurizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciência dos Alimentos da Universidade de Purdue, West Lafayette, Indiana, U.S.A., em 1974.

2.1. *Fonte das Amostras*

As amostras dos produtos recém-pasteurizados, embalados em pacotes de papel especial («paper cartons»), foram obtidas diretamente nos laticínios que abastecem a área de Lafayette. No primeiro experimento foram usadas amostras de leite homogeneizado e pasteurizado que procederam de 4 diferentes laticínios. No segundo, empregaram-se 20 amostras de produtos de laticínios, recém-pasteurizados, incluindo 10 amostras de leite homogeneizado, 4 de leite desnatado fortificado, 4 de creme de leite e duas amostras de leite magro, 2%, obtidas de dois laticínios.

As amostras foram coletadas 24 horas após a pasteurização e transportadas para o laboratório em caixa de isopor com gelo moído, e imediatamente analisadas.

2.2. *Preparação dos Meios de Cultura*

Os meios, ágar-padrão, (Standard plate agar) ágar-infusão de coração («heart infusion agar»), ágar Rogosa (Rogosa agar) e ágar-triptona-glicose (tryptone glicose extract agar), foram preparados a partir dos respectivos meios desidratados dos Laboratórios Difco, e o ágar tripticase-soja (trypticase soy agar) foi preparado a partir do meio desidratado dos Laboratórios «Baltimore Biological», segundo as instruções contidas nos frascos.

Preparados, os meios foram divididos em porções de 100 ml, colocados em

frascos de diluição e esterilizados a 121°C, durante 15 minutos.

2.3. Preparo da Solução para Diluição das Amostras

A água de diluição foi preparada com um tampão de fosfato, como recomendado pela APHA 1972 (1).

2.4. Exames Bacteriológicos

No primeiro ensaio, as amostras frescas foram analisadas para obtenção da contagem total ou global de psicrotróficos. As amostras foram mantidas nas embalagens originais durante o armazenamento a 7°C, tendo-se tomado extremo cuidado para que não houvesse aumento de temperatura.

No segundo experimento, as amostras frescas foram analisadas para obtenção de contagens de psicrotróficos, usando-se 5 diferentes meios de cultura, ágar-padrão («standard plate agar»), ágar-infusão de coração («heart infusion agar»), ágar-tripticase-soja («trypticase soy agar») e ágar Rogosa («Rogosa agar»).

2.4.1. Contagem Global ou Total («standard plate count»)

A contagem global foi executada segundo o procedimento recomendado por «Standard Methods of Examination of Dairy Products» (1). As placas foram feitas em duplicata, tendo sido consideradas as médias das contagens das placas que apresentaram de 30 a 300 colônias. A contagem foi expressa em número de bactérias por ml.

Essa contagem foi feita apenas na primeira parte do experimento, quando somente 6 amostras foram analisadas.

Após armazenamento a 7°C, as amostras foram novamente analisadas, após 7 e 10 dias, para obtenção da contagem global.

2.4.2. Contagem de Psicrotróficos

As contagens de bactérias psicrotróficas nas amostras frescas e estocadas a 7°C, durante 5 e 10 dias, foram conduzidas de acordo com «Standard Methods for the Examination of Dairy Products» (1). As placas foram feitas em duplicata e, quando era usado 1 ml de amostra por placa e não se observava nenhuma colônia visível após a incubação, o resultado era anotado como sendo menos de 1 por ml.

No segundo experimento, as contagens de psicrotróficos foram feitas em 20 amostras, de acordo com o método-padrão, variando apenas o tipo de ágar, como descrito em 2.4. As placas foram feitas em duplicata, usando-se diluições 1/10; após a incubação, todas as colônias visíveis foram contadas com o auxílio de um contador de colônias Quebec. Devido ao pequeno número de bactérias psicrotróficas presentes no leite pasteurizado, foram consideradas, para contagem, as placas com menos de 30 colônias.

2.3.3. Análise Estatística dos Dados

Foi usado um delineamento fatorial para permitir a análise de variância dos resultados. Os valores de «F» calculados foram testados ao nível de 10% de significância ($P = 0,10$). Os cálculos foram feitos por computador, após codificação apropriada dos dados usando-se o programa de análise de variância para desenho fatorial BMDOSY, da secção de computador da Universidade de Purdue.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro estudo foram feitas contagens de psicrotróficos de 6 amostras de leite fresco homogeneizado e pasteurizado, provenientes dos laticínios A, B e C, usando-se 4 diferentes meios de cultura, a saber: ágar-padrão («standard plate agar»), ágar-infusão de coração («heart infusion agar»), agar-triptona-glicose («tryptone glucose extract agar») e ágar Rogosa («Rogosa agar»). Neste estudo foi usado 1 ml de amostra em cada placa.

Os resultados das contagens de psicrotróficos com os diferentes meios de cultura encontram-se no Quadro 1.

QUADRO 1 - Contagens de psicrotróficos em leite pasteurizado com os meios ágar-padrão (AP), ágar-infusão de coração (AIC), ágar-triptona-glicose (ATG) e ágar rogorosa (AR)

LATICÍNIOS	Nº DA AMOSTRA	CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS/ML			
		AP	AIC	ATG	AR
A	1	<1	17	10	8
B	2	<1	<1	40	20
C	3	20	100	15	30
C	4	<1	10	20	17
C	5	<1	10	1	30
D	6	1	20	15	10

Os resultados indicaram que as contagens usando o ágar-padrão foram as menores, para todas as 6 amostras analisadas. Todos os outros meios de cultura resultaram em contagens de psicrotróficos maiores que as das placas com ágar-padrão.

Também foram feitas contagem de psicrotróficos e contagem global ou total, para as 6 amostras, bem como contagens após 5 e 10 dias de estocagem das amostras a 7°C. Os resultados dessas contagens encontram-se no Quadro 2.

Vê-se, no Quadro 2, que apenas a amostra n.º 3 apresentou mais de 1 psicrotrófico por ml na amostra fresca e que, ao final de 10 dias de armazenamento a 7°C, cinco amostras apresentaram contagens de psicrotrófico superiores a 1×10^6 bactérias/ml, o que é considerado impróprio para o consumo. Esses resultados confirmam a observação de WITTHE (16), de que a contagem de psicrotróficos não tem nenhum valor para previsão da vida útil do leite pasteurizado armazenando sob refrigeração.

Com o intuito de testar com mais segurança a eficácia dos diferentes meios de cultura para detectar bactérias psicrotróficas em leite e derivados fluidos pasteurizados, um segundo estudo foi conduzido, usando-se 20 amostras e 5 diferentes meios de cultura, conforme descrito em 2.1.

Nesse caso, usou-se 1 ml da diluição 1/10 por placa em duplicata. Placas que não apresentavam colônias visíveis eram anotadas como menos que 10 (< 10) por ml.

Os resultados das contagens encontram-se no Quadro 3.

As contagens de psicrotróficos em ágar-padrão foram muito baixas nas amos-

QUADRO 2 - Contagem total e de psicrotróficos em amostras de leite pasteurizados e contagem total de psicrotróficos após 5 e 10 dias de estocagem a 7°C

LATI-	Nº DA CÍ- AMOS- NIOS	CONTAGEM TOTAL/ML			CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS/ML		
		0	5	10	0	5	10
		TRA	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias
A	1	31×10^2	70×10^3	150×10^5	<1	15×10^2	200×10^5
A	2	12×10^2	40×10^3	2210×10^5	<1	31×10^2	2000×10^5
B	3	15×10^2	3500×10^3	5300×10^5	20	32000×10^2	5500×10^5
B	4	10×10^2	6×10^3	50×10^5	<1	5×10^2	43×10^5
B	5	4×10^2	$0,7 \times 10^3$	3×10^5	<1	$0,4 \times 10^2$	115×10^5
C	6	7×10^2	5×10^3	300×10^5	<1	3×10^2	500×10^5

tras frescas: onze das 20 amostras apresentaram <10 bactérias psicrotróficas por ml. Esses resultado não concordam com os obtidos por OLIVEIRA (9), que encontrou pelo menos 15 psicrotróficos por ml em todas as amostras de produtos pasteurizados analisados.

A análise de variância dos resultados está resumida no Quadro 4; vêem-se ali as diferenças significativas entre as contagens das amostras dos dois laticínios e diferenças significativas entre as contagens quando diferentes meios de cultura foram utilizados. Não foi observada diferença significativa na interação laticínios e meio de cultura, o que indica que os meios podem ser usados indistintamente em qualquer dos laticínios.

As médias marginais das contagens de bactérias psicrotróficas para cada meio de cultura foram as seguintes: ágar-padrão (AP), 13,25 por ml; ágar-infusão de coração (AIC), 123,15 por ml; ágar-tripticase-soja (ATS), 60,75 por ml; ágar-triptona-glicose (ATG), 40,00 por ml; ágar-Rogosa (AR), 57,25 por ml.

As médias dos resultados indicam que placas com ágar-infusão de coração deram contagens mais altas de psicrotróficos que qualquer outro meio de cultura usado, quando incubadas a 7°C, durante 10 dias.

A média marginal das contagens das amostras do laticínio A foi de 31,80 por ml; a do laticínio B, 86,00 por ml.

Na análise estatística, zero foi usado no lugar de <1 por ml, para que fosse possível a análise dos resultados.

Em seus estudos, HEATHER e VAN DER ZANT (6, 7) mostraram que as bactérias que sofreram choque térmico ou que estavam dormentes necessitavam de alguns nutrientes específicos para readquirirem o vigor.

O ágar-infusão de coração contém mais nutrientes que o ágar-padrão, nutrientes estes que promovem a recuperação das bactérias psicrotróficas que sofreram choque térmico e que apresentam, em razão disso, maiores e mais consistentes contagens durante todo o experimento.

As bactérias que sofreram choque térmico podem ser capazes de crescer em determinado meio onde haja maior riqueza em nutrientes e não crescer num meio de cultura mais pobre.

Tudo indica que o melhor comportamento de certos meios de cultura na de-

QUADRO 3 - Contagem, em duplicita, de psicrotróficos em leite e derivados fluidos pasteurizados, usando como meios de cultura ágar-padrão (AP), ágar-infusão do coração (AIC), ágar-tripticase-soja (TS), ágar-triptona-glicose (ATG) e ágar Rogosa (AR)

LATI- CÍ- NIOS	Nº DA AMOS- TRA	Nº DA PLACA	CONTAGENS DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS/ML				
			AP (1)	AIC (2)	ATS (3)	ATG (4)	AR (5)
A	1	1	10	40	20	10	20
		2	10	30	30	10	10
A	2	1	<10	90	50	10	40
		2	<10	70	30	10	10
A	3	1	20	90	10	40	30
		2	10	100	20	10	20
A	4	1	<10	50	10	10	40
		2	10	90	10	20	30
A	5	1	10	100	10	40	30
		2	10	70	60	20	<10
A	6	1	<10	40	30	20	<10
		2	10	70	20	50	10
A	7	1	10	100	30	30	30
		2	20	120	30	10	20
A	8	1	<10	40	30	10	70
		2	20	90	10	20	20
A	9	1	20	90	30	30	50
		2	<10	60	10	<10	40
A	10	1	<10	120	60	<10	70
		2	20	100	10	20	40
B	11	1	20	90	110	100	90
		2	10	160	90	120	110
B	12	1	40	150	70	80	140
		2	30	100	130	70	190
B	13	1	<10	<10	40	10	70
		2	<10	50	20	40	80
B	14	1	<10	10	90	10	30
		2	<10	50	50	20	<10
B	15	1	<10	110	150	80	60
		2	<10	200	180	60	100
B	16	1	30	240	80	30	110
		2	20	260	100	40	60
B	17	1	<10	150	40	60	100
		2	<10	100	70	60	80
B	18	1	50	510	100	30	100
		2	80	670	90	50	160
B	19	1	40	50	60	110	80
		2	10	120	100	150	30
B	20	1	10	210	70	30	70
		2	<10	120	110	10	40

AP - Ágar-padrão (Standard Method agar)

AIC - Ágar-infusão do coração (heart infusion agar)

ATS - Ágar-tripticase-soja (trypticase soy agar)

ATG - Ágar-triptona-glicose (tryptone glucose extract agar)

AR - Ágar Rogosa (Rogosa agar).

QUADRO 4 - Resumo da análise de variância para um desenho factorial com 20 amostras de leite e derivados fluidos pasteurizados de dois laticínios, para contagens de bactérias psicrotróficas, usando ágar-padrão, ágar-infusão de coração, ágar-tripticase-soja, ágar-triptona-glicose e ágar Rogosa, com duplicatas para cada amostra

F.V.	df	Q.M.
Laticínios	1	1468882,00 *
Resíduo A	18	8684,22
Meios de cultura	4	65882,00 *
Laticínios x Meios de cultura	4	9309,50
Resíduo B	72	5749,92
Duplicatas	100	752,00

* Significância ao nível de 10%

terminação de bactérias psicrotróficas não foi considerado no estabelecimento do método-padrão para determinação desses microrganismos em produtos de laticínios.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciência de Alimentos da Universidade de Purdue, West Lafayette, Indiana, U.S.A., com os objetivos de estudar a possibilidade de utilização de diferentes meios de cultura na determinação quantitativa de bactérias psicrotróficas e avaliar o uso do ágar-padrão, em comparação aos diferentes meios de cultura, na contagem de bactérias psicrotróficas em leite e derivados fluidos pasteurizados.

No primeiro experimento, utilizaram-se 6 amostras de leite homogeneizado pasteurizado, provenientes de 4 laticínios. Um segundo experimento foi conduzido com 20 amostras de produtos de laticínios, recém-pasteurizados. Foram feitas contagens de bactérias psicrotróficas usando-se os seguintes meios de cultura: ágar-padrão (AP), ágar-infusão de coração (AIC), ágar-tripticase-soja (ATS), ágar-triptona-glucose (ATG) e ágar Rogosa (AR).

A análise de variância dos resultados indicou diferença significativa entre as contagens quando diferentes meios de cultura foram utilizados.

Dentre as conclusões gerais extraídas deste estudo, as mais importantes foram:

- O ágar-padrão, recomendado pela APHA, no Standard Methods for the Examination of Dairy Products, para determinação de bactérias psicrotróficas, não é o meio de cultura mais indicado para essa determinação, principalmente quando está sendo utilizado para prever a vida útil do leite e derivados fluidos pasteurizados.
- Diferentes meios de culturas utilizados na determinação de bactérias psicrotróficas em leite e derivados fluidos pasteurizados resultam em conta-

gens diferentes pelo método-padrão.

3. O uso do ágar-infusão de coração (AIC), que contém mais nutrientes que o ágar-padrão, resultou em contagens bem superiores para as mesmas amostras; logo, é um meio de cultura mais indicado para previsão da vida útil de leite e derivados armazenados sob refrigeração.

5. SUMMARY

To determine the suitability of standard methods agar for the enumeration of psychrotrophs, standard methods agar, heart infusion agar, tryptone glucose extract agar, trypticase soy agar and Rogosa agar were used as the plating media. The differences in psychrotrophic counts when the different media were used were significant at $P = 0.10$. The highest counts were observed when heart infusion agar was used as the plating medium. This was followed by trypticase soy agar, Rogosa agar, tryptone glucose extract agar and standard methods agar.

6. LITERATURA CITADA

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of dairy products* 13th ed. New York, American Public Health Association, Inc., 1972.
2. ATHERTON, H.V., DOAN, F.J. & WATROUS, G.H. Jr. Changes in bacteria population on characteristics of bottled market milk during refrigeration holding. *J. Dairy Sci.* 36:570. 1953.
3. DABBAH, R., MOATS, W.A. & MATTICK, J. F. Factors affecting resistance to heat and recovery of heat-injured bacteria. *J. Dairy. Sci.*, 52:608-614. 1969.
4. EDDY, B.P. The use and meaning of the term psychrophilic. *J. Appl. Bacteriol.* 23(2):189-190. 1960.
5. ESCASSA, M.A.S. *Bacteriological and flavor quality of fluid milk in Indiana*. West Lafayette, Indiana, Purdue University Library, 1970, 70 p. (Tese M.S.).
6. HEATHER, C.D. & VAN DER ZANT, W.C. Effects of temperature and time of incubation and pH of plating medium on enumerating heat-treated psychrophilic bacteria. *J. Dairy Sci.* 40:1079-1082. 1957.
7. HEATHER, C.D. & VAN DER ZANT, W.C. Effects of the plating medium on the survival of heat-treated cells of *Pseudomonas fluorescens*. *Food Res.* 22: 164-166. 1957.
8. MOSSEL, D.A.A. & ZWART, H. The rapid tentative recognition of psychrotrophic types among Enterobacteriaceae isolated from foods. *J. Appl. Bacteriol.* 23:185-190. 1960.
9. OLIVEIRA, J.S., *Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk*. West Lafayette, Indiana, Purdue University Library, 1973. 110 p. (Tese Ph.D.).

10. OLSON, M.C. Selective media for detecting spoilage organisms in dairy products. *J. Dairy Sci.* 44:970-971. 1961.
11. OLSON, M.C. Bacteriological testing of milk for regulatory purposes, usefulness of current procedures and recomendations for change. *J. Milk Food Technol.* 34:279-284. 1971.
12. OLSON, H.C.Jr., PARKER, R.B. & MULLER, W.S. The nature, significance and control of psychrophilic bacteria in dairy products. *J. Milk Food Technol.* 18:200-209. 1955.
13. RANDOLPH, H.E., FREEMAN, T.R. & PETERSON, R.W. Keeping quality of market milk obtained at retail outlets and at processing plants. *J. Milk Food Technol.* 28:92-98. 1965.
14. ROGICK, F.A. & BURGWALD, L.H. Some factors which contribute to the psychrophilic bacteria count in market milk. *J. Milk Food Technol.* 15:181-186. 1952.
15. VILLELA, J.O.P. 1973. *The isolation and characterization of slow reducing psychrotrophis*. West Lafayette, Indiana, Purdue University Library, 1973. 60 p. (Tese M.S.).
16. WITTHER, L.D. Psychrophilic bacteria. A Review. *J. Dairy Sci.* 44:983-1015. 1971.