

MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS  
II - ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE LEITE<sup>1</sup>

S.Joly<sup>2</sup>

RESUMO

Foi analisado o produto dos três laticínios que fornecem leite à população piracicabana, sob a designação de pasteurizado tipo C.

Procedeu-se a análise bacteriológica de coliformes, de anaeróbios esporulados, bem como a prova da redutase microbiana.

As amostras de leite examinadas revelaram estado sanitário precário: as amostras 1 e 3 continham 1600 coliformes por 100 ml da amostra (N.M.P.) e a amostra 2, 350 por 100 ml.

Quanto à presença da redutase microbiana a amostra 1 se classificou como ruim porque continha 20 milhões de células por ml, enquanto as amostras 2 e 3 como procedentes de leite bom, com 500 mil por ml, mas com a agravante de se apresentar peptonizada em 24 horas.

INTRODUÇÃO

Prosseguindo o estudo da microbiologia de alimentos por nós já iniciado com o isolamento de bactérias de sorvetes produzidos em fábrica (JOLY, -), desejamos agora uma verificação do que ocorre com o leite fornecido à população de Piracicaba.

O leite não contém, a rigor, bactérias; é uma secreção glandular estéril, quando o animal não é portador de moléstia.

<sup>1</sup> Entregue para publicação em 23/11/1970

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia Rural, E.S.A. "Luiz de Queiroz" USP - Piracicaba.

Porém, são numerosas as possibilidades para o leite adquirir microrganismos, desde o instante da ordenha até o momento do consumo.

Entre êsses organismos assim considerados podem se citar aquêles cuja presença, apesar de inócua ao organismo humano, pode depreciar sua qualidade, quando em quantidade elevada: tratando-se por outro lado de microrganismos de determinados grupos, pode impugnar o leite ao consumo, pois denunciam a contaminação com matéria fecal humana ou animal; em circunstâncias especiais, a eventual presença de bactérias patogênicas coloca o produto completamente à margem de sua utilidade normal.

Sendo o leite um alimento de primeira necessidade é ingerido diariamente pelo povo; é um meio de cultura assaz rico para a proliferação de bactérias, razão pela qual há necessidade de um certo contrôle para salvaguardar a saúde pública.

O leite que é fornecido à nossa população, sob a indicação de tipo C, é embalado em envólucro plástico adequado, destinado ao imediato consumo, dispensando portanto qualquer medida de segurança como a fervura, tendo-se em vista que fôra pasteurizado na usina.

Limitamo-nos a análises um tanto restritas, por uma série de razões que nos coíbem, pelo menos de início, a pesquisas que nos fornecessem informações mais amplas e completas.

Prescindimos das análises bioquímicas porque o leite em aprêço é pasteurizado e por isso já privado de enzimas tais como a redutase celular, peroxidase e propriedades coloidais (SARTORY, 1950).

Dentre as provas estritamente bacteriológicas escolhemos apenas aquelas cujos resultados são mais concludentes, tais como a pesquisa dos coliformes e a prova da redutase microbiana, por si suficientes para demonstrar as condições sanitárias do leite fornecido à população.

A pesquisa dos coliformes e da redutase microbiana nos conduzem também a dados quantitativos (LIMA, 1945).

Houvemos por bem realizar, com os anaeróbicos esporulados, o mesmo procedimento feito com os coliformes, apoiados nas seguintes razões (SARTORY, 1950): os anaeróbios são

muito abundantes em dejectos, constituindo sua presença, nas águas, um índice seguro de contaminação e "ipso fato", quando presentes no leite.

#### MATERIAL E MÉTODOS

São apenas três os laticínios que fornecem à nossa cidade, distribuindo o leite pasteurizado tipo C, em recipiente plástico.

Foram adquiridas, em estabelecimentos comerciais, as amostras utilizadas neste trabalho, porém, em embalagem original.

##### Pesquisa dos Coliformes

Foi usado o caldo lactosado, em tubos providos com campânula de Durham.

Três séries de tubos foram inoculados, com 10, 1 e 0,1 ml do inóculo, com 5 repetições, incubando-se a 37°C, por 24 horas.

##### Pesquisa dos Anaeróbios Esporulados

Foram inoculados três séries de tubos, com 10, 1 e 0,1 ml do inóculo, com 5 repetições.

A inoculação foi feita em caldo glicosado, fervido no momento de usar, para exaustão do ar.

O inóculo foi mantido a 80°C, por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas.

Após a inoculação, os tubos foram selados com parafina e incubados a 37°C, por 24 horas.

##### Pesquisa da Redutase Microbiana

Foram colocados 10 ml da amostra em tubo estéril, adicionado de azul de metileno na proporção de 0,0005% e selados com vaselina líquida.

Foram incubados a 37°C, com observação após 20 minutos, 2 horas e 5 horas, até a redução completa do azul de metileno.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Resultado do Teste para Coliformes

#### Coliformes da Amostra 1

Cinco tubos positivos com 10 ml do inóculo  
Cinco tubos positivos com 1 ml do inóculo  
Quatro tubos positivos com 0,1 ml do inóculo  
Essa quantidade de tubos positivos equivale a  
1.600 bactérias por 100 ml da amostra.

#### Coliformes da Amostra 2

Cinco tubos positivos com 10 ml do inóculo  
Cinco tubos positivos com 1 ml do inóculo  
Um tubo positivo com 0,1 ml do inóculo  
Este resultado equivale a 350 bactérias por 100  
ml da amostra.

#### Coliformes da Amostra 3

Cinco tubos positivos com 10 ml do inóculo  
Cinco tubos positivos com 1 ml do inóculo  
Quatro tubos positivos com 0,1 ml do inóculo  
Representam 1.600 bactérias por 100 ml da amostra.

### Resultados do Teste para Anaeróbios Esporulados

#### Anaeróbios Esporulados da Amostra 1

Um tubo positivo com 10 ml do inóculo  
Um tubo positivo com 0,1 ml do inóculo  
Representam 4 bactérias por 100 ml da amostra.

#### Anaeróbios Esporulados da Amostra 2

Três tubos positivos com 10 ml do inóculo  
Representam 8 bactérias por 100 ml da amostra.

#### Anaeróbios Esporulados da Amostra 3

Um tubo positivo com 10 ml do inóculo  
Um tubo positivo com 1 ml do inóculo  
Isto representa 4 bactérias por 100 ml da amostra.

### Resultado da Prova de Redutase Microbiana

#### Redutase da Amostra 1

Redução completa do azul de metileno em 1 hora  
Mantém-se coagulado  
A redução do azul de metileno nesse tempo, equi-  
vale à presença de até 20 milhões de células por ml.

Uma amostra assim pertence ao III grupo dessa tabela de classificação, ou seja, leite ruim (LIMA, 1945).

Redutase da Amostra 2

Não reduz o azul de metileno. Porém, peptoniza o leite em 24 horas.

A classificação dessa amostra está no I grupo, ou seja, leite bom, com menos de 500 mil células por ml.

Redutase da Amostra 3

Só reduz o azul de metileno após 5 horas, com peptonização completa em 24 horas.

Também esta amostra se coloca no grupo I, como leite bom, com menos de 500 mil células por ml.

As amostras analisadas pertencem ao tipo C.

É evidente que o tipo C é aquele para o qual é permitido toda violação da escala estabelecida para o tipo B.

Então, são várias as causas que motivam a variação do grau sanitário, tais como as acomodações da laticínio, a qualidade da água de seu suprimento, a desinfecção dos utensílios usados na mesma, o manuseio do leite e o descuido da saúde dos rebanhos e dos operários.

É necessário também que se considere que as normas bacteriológicas para o leite, são adotadas diferentemente, de acordo com os países em questão, não sendo possível uma comparação rigorosa com os padrões estrangeiros.

Entretanto, isso não vem eliminar a necessidade de se atender às exigências sanitárias.

O próprio fato da pasteurização do leite é suficiente para destruir a capacidade bactericida de que é dotado um leite cru, predispondo-o a contrair contaminação, mas se o leite é embalado em recipiente adequado na usina de origem, não há razão para as contaminações verificadas.

Os resultados registrados com três séries de tubos e 5 repetições para a pesquisa dos coliformes e dos anaeróbios esporulados nos permitem uma avaliação quantitativa de bactérias presentes, usando a tabela de "Standard Methods for the Examinations of Water and Sewage", 1946.

Esta tabela, baseada na probabilidade, permite atribuir valores numéricos em função da série geométrica das inoculações feitas, segundo o que já foi acima mencionado.

Êstes valores recebem a denominação de número mais provável (N.M.P.) por 100 ml da amostra.

Esta tabela é usada pela "Saúde Pública dos EE. UU., para exame bacteriológico de água.

Dentro dêsse critério podemos colocar nossa análise de leite.

A amostra 1 e 3 apresentam igual número de coliformes, ou seja, 1.600 bactérias por 100 ml da amostra.

O mesmo acontece com os anaeróbios; a amostra 1 e 3 contêm 4 bactérias por 100 ml da amostra.

A amostra 2 difere das demais; apresenta 350 coliformes por 100 ml da amostra e 8 anaeróbios por 100 ml da amostra.

Se levássemos em conta apenas o número de coliformes para julgar o grau de contaminação dessas 3 amostras, haveríamos de inferir que a de número 2 é a melhor, porque menos contaminada e as outras 2 em condição inferior.

Entretanto, deve-se considerar o fato que os anaeróbios revelam com mais segurança uma contaminação com matéria fecal, enquanto os coliformes são organismos ubiquitários, resultando portanto que nem sempre sua presença assegura de modo absoluto a origem de detritos animais.

Em abono a esta afirmação está o fato que o número de células encontradas numa água é sempre menor em relação às de coliformes.

Em suma, uma relação entre êsses dois valores encontrados é que sintetiza a expressão da pesquisa.

Essa relação se traduz pelo índice anaeróbico, segundo uma convenção internacional, reportando-se a 1.000 coliformes (SARTORY, 1950).

Isto posto nos conduz ao seguinte:

$$\text{amostra 1 e 3} \quad I = \frac{4}{1600} \times 1000 = 2,5$$

$$\text{amostra 2} \quad I = \frac{8}{350} \times 1000 = 22,8$$

Portanto, a amostra 2 está em piores condições, apesar de conter menor número de coliformes.

O que está em aparente desacôrdo são os resultados da redutase microbiana.

Assim, a amostra 1 se classificou como leite ruim (LIMA, 1945), porque descora o azul de metileno em menos de 2 horas, com até 20 milhões de bactérias por 100 ml e as amostras 2 e 3 se classificaram como procedentes de leite bom; nesse critério, com 500 mil bactérias.

Deve-se considerar que o fenômeno de descorar o azul de metileno é uma atribuição de bactérias do gênero *Streptococcus*, sendo uma informação à parte; realmente tem alto significado pois um leite com tal contaminação pode ser impugnado com real razão, pois nesse gênero está o grupo enterococos, cujo habitat é o intestino animal.

O que agrava a qualidade das amostra 2 e 3 em relação à redutase é o fato de peptonizar completamente a caseína do leite em 24 horas.

Este aspecto não é próprio nem dos *Streptococcus* e nem dos *Lactobacillus*, prenunciando portanto outro organismo presente.

#### CONCLUSÕES

A julgar pelo critério de avaliação da qualidade pelo número de coliformes, todas essas amostras estariam classificadas como "insatisfatórias".

Segundo o critério da redutase microbiana, as amostras 2 e 3 seriam classificadas como procedentes de bom leite.

Levando em consideração a relação entre anaeróbios e aeróbios presente, as amostras 1 e 3 têm um índice baixo, enquanto a amostra 2 tem um índice bastante elevado.

Daí concluímos que tódas as amostras estão condenadas, pelo seguinte: a amostra 1 procede de leite ruim, pela classificação da redutase; a amostra 2 tem um índice anaeróbico muito elevado, sendo êste critério o mais válido, a nosso ver; a amostra 3 que é de leite bom, segundo a prova da redutase, contém microrganismos que peptonizam o leite em 24 horas.

Êstes fatos permitem afirmar que há urgente necessidade de fiscalização do leite que é distribuído à população.

Enquanto essa medida continuar negligenciada é indispensável uma certa precaução por parte dos consumidores, não ingerindo leite sem prévia fervura.

É incoerente a proibição existente para o consumo do leite "in natura", por parte das autoridades sanitárias.

Êstes resultados demonstram que a abundante contaminação dos sorvetes de fábrica por nós estudados (JOLY, - ) pode ter como causa o leite que na realidade era uma das matérias primas usadas nas indústrias de refrigerante.

#### SUMMARY

This paper describes the results obtained from bacteriological analysis of 3 milk samples.

It has been assumed that all milk samples have a high contamination level; for this reason the milk that is distributed to the people may be boiled prior to use, in order to protect the human health.

The author claims that anaerobic microorganisms have an important role in bacteriological water analysis and related ones.

Thus it is quite clear that there is a ratio between the amounts of these bacteria groups.

One such method would achieve best results in bacteriological analysis.

LITERATURA CITADA

JOLY, S. - No prelo. Microbiologia de alimentos. 1. Isolamento de microrganismos de sorvetes de fábrica.

LIMA, J.P. de C. - 1945 - Bacteriologia. 4ª edição - São Paulo. Brasil.

SARTORY, A. et al - 1950 - Microbiologia pratique - Paris.

STANDARD MEHTODS FOR EXAMINATIONS OF WATER AND SEWAGE - 1946 - Public Health Association - New York.

