

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Tese para obtenção do MESTRADO em Tecnologia de Alimentos.

Abril de 1975.

APLICAÇÃO DE UM MÉTODO RÁPIDO PARA CONTAGEM  
DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS  
NO LEITE

Hugo Humberto Montoya Villafañe

ORIENTADOR:

José Sátiro de Oliveira

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

O autor

dedica este trabalho a sua  
mãe Nelly, seu pai Humberto,  
seus irmãos e seus avós.

## AGRADECIMENTOS

O autor expressa os mais sinceros agradecimentos ao Dr. José Sãtiro de Oliveira pela valiosa colaboração na orientação deste trabalho.

Agradece, especialmente, ao Dr. André Tosello, diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, pelas facilidades proporcionadas. Agradece também a Organização dos Estados Americanos (OEA), pela bolsa de estudos recebida.

Finalmente, estende seus agradecimentos a todos que, de uma forma ou de outra, ajudaram na realização desta tese.

## INDICE GERAL

|                                                                                   | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------|
| INDICE DE QUADROS.....                                                            | v      |
| INDICE DE FIGURAS.....                                                            | vi     |
| RESUMO.....                                                                       | 1      |
| SUMMARY.....                                                                      | 2      |
| INTRODUÇÃO.....                                                                   | 3      |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                        | 5      |
| Microrganismos Psicrotróficos.....                                                | 5      |
| Definição.....                                                                    | 5      |
| Temperaturas de Crescimento.....                                                  | 6      |
| Microrganismos Envolvidos.....                                                    | 6      |
| Importância.....                                                                  | 7      |
| Enumeração dos Microrganismos Psicrotróficos.....                                 | 10     |
| Método Padrão.....                                                                | 11     |
| Métodos Rápidos.....                                                              | 11     |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                           | 15     |
| Coleta das Amostras.....                                                          | 15     |
| Leite Cru.....                                                                    | 15     |
| Leite Pasteurizado.....                                                           | 15     |
| Meio de Cultura.....                                                              | 16     |
| Solução Tampão.....                                                               | 16     |
| Contagens Microbiológicas.....                                                    | 16     |
| Avaliação Estatística.....                                                        | 17     |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                       | 18     |
| Contagem Total.....                                                               | 18     |
| Contagem de Psicrotróficos.....                                                   | 20     |
| Aplicação do Método 21°C/25 hr.....                                               | 22     |
| Obtenção da Contagem Total Aproveitando o Novo<br>Método para Psicrotróficos..... | 25     |

|                  |    |
|------------------|----|
| CONCLUSÕES.....  | 30 |
| REFERÊNCIAS..... | 31 |
| APÊNDICE.....    | 33 |

## INDICE DE QUADROS

| Quadro |                                                                                                                         | Página |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Contagens totais/ml das amostras de leite cru e pasteurizado, dos tipos B e C.....                                      | 18     |
| 2      | Contagens de psicrotróficos nas amostras de leite cru e pasteurizado, tipos B e C.....                                  | 21     |
| 3      | Contagens de psicrotróficos pelo novo <u>método</u> e pelo método padrão, nas amostras de leite cru e pasteurizado..... | 33     |
| 4      | Contagens totais nas amostras de leite cru e pasteurizado, utilizando o novo <u>método</u> e o método padrão.....       | 39     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |                                                                                                                                                                                     | Página |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Comparação gráfica das contagens de psicrotró-<br>ficos em 60 amostras de leite cru, utilizando<br>o método padrão a 7°C/10 dias e o novo método<br>a 21°C/25 hr.....               | 23     |
| 2      | Comparação gráfica das contagens de psicrotró-<br>ficos em 70 amostras de leite pasteurizado,<br>utilizando o método padrão a 7°C/10 dias e o<br>novo método a 21°C/25 hr.....      | 24     |
| 3      | Comparação gráfica das contagens totais em 60<br>amostras de leite cru, utilizando o método pa-<br>drão a 32°C/48 hr e a nova adaptação a 21°C/25<br>hr mais 32°C/23 hr.....        | 27     |
| 4      | Comparação gráfica das contagens totais em 72<br>amostras de leite pasteurizado, utilizando o<br>método padrão a 32°C/48 hr e a nova adaptação<br>a 21°C/25 hr mais 32°C/23 hr..... | 28     |

## RESUMO

A refrigeração é a forma universalmente aceita para controlar o crescimento dos microrganismos no leite e por isso, vem sendo cada vez mais adotada na fazenda, na indústria e no comércio para aumentar a conservação do leite e seus derivados. Em consequência disto, o grupo de microrganismos capaz de se multiplicar sob refrigeração a temperaturas entre 0 a 10°C, vem recebendo crescente atenção dos pesquisadores. Este grupo é, atualmente, denominado microrganismos psicotróficos.

Tendo em vista que o método padrão para contagem de psicotróficos recomenda incubação a 7°C por 10 dias, sendo, portanto, um método de pouca utilidade prática, este trabalho foi realizado a fim de estudar a aplicação de um método rápido desenvolvido recentemente. E para isto foram utilizadas amostras de leite cru e pasteurizado, coletadas na região de Campinas, SP.

Os resultados demonstraram que o novo método rápido, que utiliza incubação a 21°C por apenas 25 hr, funciona muito bem tanto para leite cru como pasteurizado, seja qual for o número de psicotróficos existentes na amostra.

Os resultados indicaram também que os microrganismos psicotróficos são de considerável importância, apesar do emprego da refrigeração ainda não ser tão generalizado entre os produtores e laticínios brasileiros.

## SUMMARY

Refrigeration is universally accepted for controlling microbial growth in milk and because of this, it has been increasingly used on the farm, in the dairy plant and during marketing to prolong the storage life of milk and dairy products. Consequently, the group of microorganisms which is able to grow at temperatures between 0 and 10°C has received increasing attention from microbiologists. This group of microorganisms is referred to as psychrotrophs.

The standard method for enumerating psychrotrophs recommends an incubation at 7°C for 10 days, which makes this method of very little practical use because of the time consumed. Therefore this work was undertaken to study the applicability of a rapide method developed recently. For this raw and pasteurized milk samples collected in the area of Campinas - SP, were used.

The results demonstrated that the new rapid method, which uses an incubation at 21°C for just 25 hr, is very reliable for enumerating in either raw or pasteurized milk samples.

The results also indicated that the psychrotrophic microorganisms are of considerable importance in Brazil, even though the use of refrigeration is not generalized among the milk producers and dairy industries.

## INTRODUÇÃO

O leite é um excelente meio de cultura, oferecendo ótimas condições de crescimento para maioria dos microrganismos comumente encontrados na natureza. Ao ser ordenhado e manuseado, da fazenda até a usina de beneficiamento, o leite pode sofrer uma série de contaminações, sendo por isto, portador de uma flora microbiana muito complexa.

A única forma, que vem sendo aceita pelas autoridades sanitárias, para diminuir a velocidade de crescimento dos contaminantes do leite, é através do controle da temperatura; procurando resfriar o leite o mais rápido possível. A maioria dos contaminantes naturais do leite, em nossas condições, são mesófilos e apresentam crescimento ótimo a uma temperatura de 25 a 35°C. Entretanto, a medida que a refrigeração vai sendo adotada, rotineiramente, um grupo de microrganismos, capaz de crescer em condições de refrigeração, vai sendo selecionado e passa a dominar, principalmente se o período de refrigeração é relativamente longo e/ou a temperatura usada não é suficientemente baixa.

Os microrganismos capazes de crescer sob refrigeração, ou seja, em temperaturas de 0 a 10°C, são, atualmente, denominados psicotróficos. Este grupo está, cada vez mais, recebendo maior atenção dos microbiologistas de alimentos em vista do crescente emprego da refrigeração na conservação de alimentos, como leite, carne, etc.

Os métodos padrões para determinação ou contagem de psicotróficos, apresentados na literatura, baseiam-se, geralmente na incubação a temperaturas de 5 a 7°C por períodos de 5 a 10 dias. Sendo, portanto, métodos muito demorados e de pouca utilidade prática. Por isso, este trabalho foi elaborado no sentido de explorar a possibilidade da aplicação de um método rápido para determinar microrganismos psicotróficos em amostras de leite cru e pasteurizado, coletadas em uma usina de beneficiamento de leite na região de Campinas, SP.

Em 1973, Oliveira desenvolveu um método rápido, que permitiu determinar os microrganismos psicotróficos do leite em apenas 25 horas, utilizando placas preparadas com agar padrão e incubadas a 21°C. Considerando que este método ainda carece de resultados confirmatórios e também, não foi ainda testado nas condições brasileiras, o objetivo do presente trabalho foi aplicar o novo método em comparação com o método padrão, que recomenda incubação a 7°C durante 10 dias.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Microorganismos Psicotróficos

#### Definição

De acordo com Eddy (5), o termo psicotrófico define os microrganismos capazes de se multiplicarem a 5°C, ou a temperaturas mais baixas, independentemente da temperatura ótima para seu crescimento. Até cerca de 1965 esse grupo de microrganismos foi denominado, ambigualmente, psicrófilo, que significa amantes de baixas temperaturas. Já em 1961, Witter (25) teceu uma série de considerações com relação à impropriedade deste termo porque a maioria destes microrganismos, apesar de crescerem a temperaturas de refrigeração (2-7°C), têm como ótimo de crescimento temperaturas na faixa de 20 a 30°C, portanto não são amantes de baixas temperaturas.

Em vista das explicações acima, o termo psicotrófico tem sido bem aceito porque tal terminologia implica que os microrganismos são capazes de crescerem a baixas temperaturas, mesmo que tenham preferência por temperaturas bem mais elevadas. Desta forma o "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (1) adotou, na 13ª edição, a substituição do termo psicrófilo pelo termo psicotrófico, para definir os microrganismos capazes de formarem colônias visíveis em placas de agar padrão (GTL-agar) incubadas a 7°C por 10 dias.

### Temperaturas de Crescimento

Como indicado na definição, os psicrotróficos são capazes de crescer, relativamente rápido, a temperaturas de 7°C, ou mais baixas; entretanto a temperatura ótima de crescimento varia consideravelmente. Segundo Witter (25) não existem muitos trabalhos dedicados à determinação das temperaturas ótimas de crescimento para os psicrotróficos, porque a classificação deles, em geral, depende exclusivamente da habilidade de crescer em condições de refrigeração.

As informações existentes indicam que as temperaturas ótimas de crescimento para os psicrotróficos, variam de 20 a 40°C. De acordo com outras revisões (12 e 23), muitos investigadores concordam que a maioria dos psicrotróficos cresce melhor na faixa de 20 a 30°C, alguns entre 30 e 35°C e raros são os que preferem temperaturas abaixo de 20°C.

A maior parte dos livros textos fixam 0°C como limite mínimo para o crescimento das bactérias em geral, todavia de acordo com Witter (25), muitos investigadores têm observado crescimento à temperaturas abaixo deste limite. Ele concluiu que o crescimento continua sendo possível até, aproximadamente, 10°C abaixo de zero.

### Microorganismos Envolvidos

A maioria dos gêneros de bactérias relacionados com os alimentos, é representada no grupo de psicrotróficos. Witter (25) enumerou 21 gêneros que contêm espécies de bactérias psicrotróficas. Dentre esses gêneros apenas sete são os mais importantes em leite e derivados (12), seis dos quais são basto

netes Gram negativos, não esporulados, incluindo os seguintes gêneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Escherichia* e *Aerobacter*. *Micrococcus* constitui o sétimo gênero, representando o grupo de bactérias Gram positivas.

Muitos investigadores são unânimes em afirmar que os microrganismos psicrotróficos são todos Gram negativos e relutam em aceitar a inclusão de bactérias Gram positivas dentre os psicrotróficos, porém além de *Micrococcus*, outros gêneros como *Streptococcus*, *Bacillus*, etc, têm sido frequentemente encontrados neste grupo (2, 4, 8 e 18).

Shehata e Collins (21) conseguiram isolar espécies de *Bacillus* em 25 a 35% das amostras de leite cru por eles examinadas. Eles consideram esses psicrotróficos como sendo linhagens de bacilos mesofílicos, adaptados a baixas temperaturas.

De acordo com Witter (25) o gênero de bactérias psicrotróficas predominante é *Pseudomonas* e as espécies predominantes desse gênero são: *P. putrefaciens*, *P. fragi* e *P. fluorescens*. Essas espécies são quase sempre as escolhidas nas pesquisas sobre características típicas de psicrotróficos, tais como: lipólise, proteólise, resistência térmica, etc. *P. putrefaciens* é associada principalmente com proteólise; *P. fragi* com lipólise e *P. fluorescens* com ambas.

### Importância

A importância do grupo de bactérias psicrotróficas tem sido aumentada devido ao uso crescente da refrigeração para prolongar o período de armazenamento do leite nas fazendas, nas indústrias, na comercialização e no refrigerador do consu

midor. Por serem capazes de crescer sob refrigeração, podem estragar o leite e alguns dos seus derivados, quando armazenados em temperaturas de 1 a 7°C.

Witter (25), na sua extensa revisão, concluiu que a vida de armazenamento do leite e o crescimento de psicotróficos, estão intimamente ligados, porém ainda não existia um teste capaz de predizer, com precisão, a vida útil do produto. Nem mesmo a contagem inicial de psicotróficos dava informações precisas, porque a atividade bioquímica e a velocidade de crescimento, são mais importantes do que o número inicial desses microrganismos no leite.

Na faixa de 1 a 7°C, a velocidade de crescimento dos psicotróficos varia consideravelmente, concluíram Thomas e Druce (23). Conservando-se o leite a 7°C em vez de 4,4°C, já é o suficiente para observar um crescimento muito mais rápido; por esta razão a temperatura máxima de 4°C foi recomendada para o armazenamento de leite cru nas fazendas e na indústria. Outros autores (7) afirmam que pelo simples abaixamento da temperatura de 5 para 0°C, se pode dobrar a vida útil do leite.

Tem sido enfatizado (12) que boas práticas sanitárias nas fazendas têm grande influência na composição da flora do leite. A importância da redução da contaminação com psicotróficos deveria ser enfatizada, particularmente, em vista da prática usual de conservar o leite cru, sob refrigeração, por períodos, relativamente, longos (1 a 2 dias na fazenda e até 3 dias na indústria). A contagem de psicotróficos, foi o único teste que melhor se correlacionou com o grau de limpeza na fazenda; entretanto o tempo requerido para avaliação dos resulta

dos torna o teste de pouco valor prático (17).

Johns (9) concluiu que os microrganismos mais importantes no leite cru refrigerado são os psicrotróficos, e que eles provêm principalmente de úberes sujos e equipamentos mal lavados. O mesmo pesquisador indicou a necessidade de um método mais rápido para detectar os psicrotróficos, concluiu, também, que a contagem total de mesófilos nem sempre incluía todos os psicrotróficos presentes no leite. Quando se trata de leite refrigerado, muito frequentemente esta contagem apresenta valores inferiores aos obtidos na contagem de psicrotróficos.

Muitos investigadores têm indicado que os psicrotróficos não sobrevivem à pasteurização, porque geralmente não são detectados no leite recém-pasteurizado; entretanto depois do armazenamento, a baixas temperaturas, os psicrotróficos estão quase sempre presentes (12, 23 e 25).

Macaulay (13) concluiu que quatro espécies de *Pseudomonas* e uma de *Alcaligenes*, sobreviveram à pasteurização comercial, quando a contaminação antes da pasteurização era acima de  $10^4$  microrganismos por ml. Suficiente evidência, para aceitar a existência de psicrotróficos termodúricos, foi encontrada por Witter (25), o qual sugeriu mais pesquisas nesta área.

Pesquisas têm revelado que, embora a recontaminação após a pasteurização seja evitada, algumas amostras de leite apresentam com números significantes de psicrotróficos, depois do armazenadas, após a pasteurização, a 7°C por 10 a 15 dias (19). Os psicrotróficos que resistem ao tratamento térmico não são facilmente detectados no leite recém-pasteurizado. De acordo com Witter (25), Thomas e Druce (23), os problemas causados

pelos psicrotróficos, no leite pasteurizado, são geralmente relacionados com alterações no sabor e odor, tais como: falta de frescor, amargor, putrefação, rancidez, etc. O número de microrganismos necessários para causar alterações tanto no sabor como nas características físicas do leite, não está bem documentado, porém a maioria dos autores concorda que seja de alguns milhões por ml.

Foi demonstrado (19) que se o número de bactérias psicrotróficas no leite cru for alto, alterações no sabor, amargor principalmente, podem ocorrer depois do leite ter sido pasteurizado, mesmo que os microrganismos sejam destruídos pela pasteurização. Muitas enzimas microbianas são mais resistentes ao calor do que as células vegetativas, por conseguinte, essas enzimas não inativadas continuam a agir produzindo alterações no leite durante o armazenamento, sem que haja crescimento microbiano (12, 20 e 23).

### Enumeração dos Microrganismos Psicrotróficos

Vários pesquisadores têm demonstrado especial interesse se nos microrganismos psicrotróficos. Excelentes revisões têm sido feitas sobre métodos recentes de enumeração dos psicrotróficos no leite e derivados. Bauman e Reinbold (3) revisaram as diferentes temperaturas e tempos de incubação usados nas contagens de psicrotróficos. Thomas (22) fez uma revisão completa sobre todas as tentativas de enumeração de psicrotróficos. Alguns comentários muito interessantes, sobre tentativas recentes de se desenvolver métodos rápidos para a determinação

desse grupo de bactérias no leite cru e pasteurizado, foram feitos por Luck (12).

### Método Padrão

Nos últimos 70 anos, numerosas combinações de tempo e temperatura de incubação tem sido experimentadas em tentativas de enumerar eficientemente os microrganismos psicrotróficos no leite (22). Muitos pesquisadores têm encontrado que temperaturas de incubação de 10°C ou acima, não são adequadas para determinação deste grupo, porque algumas bactérias mesofílicas são incluídas nas contagens. Temperaturas na faixa de 5 a 10°C e períodos de incubação de 7 a 14 dias, têm sido recomendados pela Associação de Saúde Pública dos Estados Unidos, na publicação dos "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (1), desde a oitava edição em 1941. Na maioria das edições, até 1967, foi recomendado faixas de temperaturas e tempo de incubação, ao invés de uma combinação definida. No entanto, foi demonstrado, que tal flexibilidade estava causando variações entre resultados de contagens de psicrotróficos obtidos por diferentes grupos de pesquisadores. Assim sendo, as duas últimas edições já padronizaram o método de enumeração dos microrganismos psicrotróficos, adotando uma incubação a 7°C por 10 dias. Esta medida tornou o método mais uniforme (1 e 17).

### Métodos Rápidos

Várias tentativas têm sido feitas para acelerar o crescimento dos microrganismos psicrotróficos e obter colônias contáveis em menos de 10 dias de incubação. Foi desenvolvido por

Leesment e Dufeu (11), um método rápido através de uma pré-incubação das placas a 17°C por 16 horas, seguida da incubação a 7°C por mais 3 dias, permitindo assim obter contagens em aproximadamente 4 dias. Eles notaram uma concordância entre este método e o método padrão a 7°C por 10 dias. Concluíram que a pré-incubação favorecia, grandemente, o crescimento dos psicrotróficos, mas não era suficiente para formar colônias visíveis. Bactérias mesófilas que poderiam crescer durante a pré-incubação, teriam seu crescimento paralizado quando as placas eram colocadas a 7°C.

Diversos métodos rápidos, incluindo o método acima, foram comparados por Waes (24). O método de Leesment e Dufeu apresentou resultados satisfatórios, quando usado no exame de leite pasteurizado, porém diferenças relativamente grandes foram observadas com leite cru.

Uma modificação no método de Leesment e Dufeu foi recomendada por Juffs (10). Ele não encontrou nenhuma diferença significativa entre as contagens obtidas pelo método padrão e as obtidas pela pré-incubação a 15°C por 24 horas, seguida por mais 3 dias a 7°C.

A grande maioria dos microrganismos psicrotróficos encontrados no leite são bactérias Gram negativas. Assim sendo, vários métodos tem sido desenvolvidos baseados nesta característica da flora psicrotrófica (22). Uma série de meios seletivos, contendo inibidores de bactérias Gram positivas, tem sido utilizados para enumerar as bactérias Gram negativas em 1 a 3 dias, empregando temperaturas de incubação na faixa de 20 a 30°C. Porém os resultados obtidos não tem sido dignos de con

fiança; talvez a exclusão de psicrotróficos Gram positivos e a inclusão de mesófilos Gram negativos, seja a principal causa disto. De acordo com Freeman e colaboradores (6), Waes (24) e Thomas (22), cristal violeta, desoxicolato de sódio, compostos quaternários de amônio e penicilina, são as substâncias mais frequentemente usadas como inibidor de Gram positivos.

O Conselho responsável pela elaboração do "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" frizou recentemente a necessidade de melhorar os métodos padrões para contagens de microrganismos de modo a incluir, eficientemente, as bactérias psicrotróficas comumente presentes no leite (15).

Existem suficientes informações afirmando que a maioria dos psicrotróficos, comumente encontrados no leite, apresenta um crescimento ótimo em temperaturas de incubação ao redor de 21°C (22 e 25). Oliveira (17) baseou-se nestas informações e pesquisou condições de incubação que acelerassem o crescimento das bactérias psicrotróficas, na tentativa de conseguir que estes microrganismos crescessem antes que as bactérias mesófilas. Placas preparadas com agar padrão (GTL-agar) e semeadas com leite cru, quando incubadas a 21°C, permitiram a formação de colônias visíveis em apenas 15 horas. Ele verificou que as colônias que se formavam primeiro eram somente de microrganismos psicrotróficos, visto que os mesófilos demoram a crescer a 21°C, por preferirem temperaturas ao redor de 35°C.

As tentativas acima, lograram êxito e foi desenvolvido um método em que os psicrotróficos puderam ser, eficientemente, enumerados em placas incubadas a 21°C durante 25 horas. Não houve diferença estatística entre as contagens obtidas pelo novo método e pelo método padrão a 7°C por 10 dias.

Observou ainda Oliveira (17), que as placas utilizadas na obtenção das contagens de psicrotróficos, pela incubação a 25 hr, eram re-incubadas a 32°C por 23 hr adicionais e conta das novamente. Estas contagens correspondiam, com vantagens, às contagens totais obtidas pelo método padrão a 32°C por 48 horas. Desta forma, com uma única operação de plaqueamento, era possível obter-se a contagem de psicrotróficos e a total, dentro de um período de 48 horas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Durante a execução deste trabalho foi utilizado material comumente encontrado em um laboratório de microbiologia de alimentos. As amostras de leite cru e pasteurizado, dos tipos B e C, vieram de diferentes regiões do Estado de São Paulo e foram coletadas em uma usina de beneficiamento de leite, localizada na região de Campinas.

### Coleta das Amostras

#### Leite Cru

As amostras de leite cru foram coletadas em tubos de ensaio com tampa rosqueável (Pyrex 16 x 150 mm), devidamente esterilizados. Foram coletadas amostras tanto de latões como de carretas isotérmicas. O leite de latões, na maioria do tipo B, se encontrava a temperatura ambiente, já o das carretas isotérmicas, do tipo C, estava refrigerado a 5-8°C.

#### Leite Pasteurizado

As amostras de leite pasteurizado foram coletadas nas embalagens originais, ou seja, saco plástico para o tipo C e papel laminado, modelo "Tetra Brick", para o B.

As amostras, tanto de leite cru como pasteurizado, foram levadas ao laboratório, dentro de aproximadamente 30 minutos, e imediatamente armazenadas em geladeira. O período trans

corrido da coleta até o término das sementeiras foi no máximo de 5 hr. Amostras de leite pasteurizado foram também armazenadas a 7°C por períodos de 24 e 48 hr, sendo sementeiras novamente após cada período de armazenamento.

#### Meio de Cultura

Tanto as contagens totais como a de psicrotróficos foram feitas utilizando glucose-triptona-extrato de levedura-agar (Standard Plate Count Agar), desidratado, da Difco, USA. O meio, preparado de acordo com as instruções do recipiente, foi distribuído em porções de 250 ml, colocado em "erlenmeyer" de 500 ml e esterilizado a 121°C por 15 minutos.

#### Solução Tampão

As diluições para contagens foram feitas utilizando-se tampão fosfato a pH 7,2, preparado de acordo com as recomendações do "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (1).

#### Contagens Microbiológicas

Tanto a contagem total como a de psicrotróficos foram feitas seguindo as recomendações do "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (1), ou seja, incubação a 32°C por 48 hr para contagem total e 7°C por 10 dias para psicrotróficos.

Foi feito um estudo comparativo empregando um método rápido para determinação de psicrotróficos (17), em que as pla

cas foram incubadas a 21°C por 25 hr. Após isto, as mesmas placas foram utilizadas para determinação da contagem total pela re-incubação a 32°C por 23 hr adicionais e este método foi comparado com o padrão. As contagens foram feitas utilizando-se de um contador de colônias tipo "Quebec Colony Counter" e os resultados foram expressos em números de microrganismos por ml de leite.

### Avaliação Estatística

O coeficiente de correlação "r" foi utilizado para avaliar a relação entre os métodos padrões e os métodos novos testados. Todos os cálculos foram feitos por computador, sendo que as contagens foram transformadas em logarítimos na base 10 antes dos cálculos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Contagem Total

Todas as amostras de leite cru e pasteurizado foram submetidas a contagens totais, de modo a permitir uma avaliação da qualidade microbiológica do leite utilizado no presente trabalho.

O Quadro 1, mostra as contagens totais realizadas nos diversos tipos de amostras, apresentadas em classes com inter

Quadro 1. Contagens totais/ml das amostras de leite cru e pasteurizado, dos tipos B e C.

| Contagens         | nº de amostras dentro de cada classe |    |                           |    |
|-------------------|--------------------------------------|----|---------------------------|----|
|                   | <u>Leite cru</u>                     |    | <u>Leite pasteurizado</u> |    |
|                   | B                                    | C  | B                         | C  |
| abaixo de $10^3$  | 0                                    | 0  | 1                         | 0  |
| $10^3$ a $10^4$   | 0                                    | 0  | 11                        | 2  |
| $10^4$ a $10^5$   | 1                                    | 0  | 2                         | 5  |
| $10^5$ a $10^6$   | 5                                    | 1  | 0                         | 3  |
| $10^6$ a $10^7$   | 14                                   | 4  | 0                         | 0  |
| $10^7$ a $10^8$   | 10                                   | 23 | 0                         | 2  |
| $10^8$ a $10^9$   | 0                                    | 2  | 0                         | 0  |
| Total de amostras | 30                                   | 30 | 14                        | 12 |

valos de uma unidade na potência de dez. Pode ser verificado que, nas amostras de leite cru, as contagens foram extremamente altas. No caso do leite tipo B, por exemplo, 80% das amostras apresentaram contagens acima de 1 milhão de colônias por ml, sendo 33% acima de 10 milhões e somente 13,3% estavam dentro das exigências legais, que é de, no máximo, 500 mil colônias/ml (16). No caso do leite tipo C, mais de 76% das amostras apresentaram contagens acima de 10 milhões. Estes resultados indicaram que, sob o ponto de vista microbiológico, não existe muita diferença entre os dois tipos de leite, quando são entregues na plataforma da indústria.

Contagens totais nos níveis dos obtidos no presente trabalho é mais provável que seja devido a contaminações mecânicas, em consequência das deficiências higiênicas no manuseio do leite e na limpeza dos equipamentos, do que multiplicação dos microrganismos no próprio leite. Isto porque, se houvesse baixa contaminação inicial e as altas contagens fossem o resultado de uma multiplicação intensa, as transformações deteriorativas seriam de tal ordem que o leite se tornaria impréstável ao consumo humano.

Após a pasteurização pôde-se notar uma sensível redução nas contagens totais de ambos os tipos de leite. O leite tipo B apresentou 85% das amostras com contagens inferiores a 10 mil colônias/ml, sendo  $21,6 \times 10^3$  a contagem mais elevada. Isto permitiu concluir que o leite B analisado após a pasteurização apresentou contagens dentro do limite fixado na legislação, ou seja, 40 mil colônias por ml (16).

Com relação ao leite C, os resultados não foram tão satisfatórios; somente 58% das amostras apresentaram contagens

abaixo de 100 mil e que foram também, as únicas abaixo de 150 mil, que é o limite legal.

Os resultados apresentados com relação ao leite pasteurizado, apesar de incluírem amostras bem representativas, por serem de misturas de leites de várias procedências, não chega a ser suficiente para tirar conclusões definitivas.

Os resultados acima, tanto para leite cru como pasteurizado, são semelhantes aos obtidos por Machado (14), que também chegou a conclusões idênticas, com relação a qualidade microbiológica do leite em nossas condições.

### Contagem de Psicrotróficos

Considerando que uma boa parte do leite, que chega a uma usina de pasteurização, foi armazenado por algum tempo sob refrigeração, é fácil entender a importância do grupo de microorganismos capaz de crescer em condições de baixas temperaturas. Este grupo é atualmente denominado psicrotróficos e tem, cada vez mais, recebido grande atenção nos países onde o uso da refrigeração é uma prática corrente para o armazenamento do leite, da ordenha à pasteurização.

O Quadro 2 mostra as contagens de psicrotróficos realizadas nos diversos tipos de leite. Os resultados indicaram que o leite cru, tanto B como C, apresentou níveis bem elevados de contaminantes psicrotróficos. Cerca de 93% das amostras de leite B, apresentaram contagens acima de 100 mil, sendo cerca de 36% abaixo de 1 milhão, 39% entre 1 a 10 milhões e 18% entre 10 a 100 milhões. Os resultados para o leite tipo C foram ainda mais elevados, com 97% das contagens acima de 1 milhão, sendo cerca de 60% no intervalo de 10 a 100 milhões.

Quadro 2. Contagens de psicrotróficos nas amostras de leite cru e pasteurizado, tipos B e C.

| Contagens         | nº de amostras dentro de cada classe |    |                           |    |
|-------------------|--------------------------------------|----|---------------------------|----|
|                   | <u>Leite cru</u>                     |    | <u>Leite pasteurizado</u> |    |
|                   | B                                    | C  | B                         | C  |
| abaixo de $10^3$  | 0                                    | 0  | 8                         | 2  |
| $10^3$ a $10^4$   | 0                                    | 0  | 2                         | 4  |
| $10^4$ a $10^5$   | 2                                    | 0  | 0                         | 3  |
| $10^5$ a $10^6$   | 10                                   | 1  | 0                         | 2  |
| $10^6$ a $10^7$   | 11                                   | 11 | 0                         | 2  |
| $10^7$ a $10^8$   | 5                                    | 19 | 0                         | 0  |
| $10^8$ a $10^9$   | 0                                    | 1  | 0                         | 0  |
| Total de amostras | 28                                   | 32 | 10                        | 13 |

Apesar de não ser tão corrente o uso de refrigeração para conservar o leite cru, os resultados indicaram que a importância dos microrganismos psicrotróficos é, praticamente, da mesma ordem que os mesófilos.

Após a pasteurização, as contagens de psicrotróficos caíram bastante, principalmente no leite B, isto é facilmente explicado pelo fato que a maioria dos psicrotróficos são facilmente destruídos pelo calor. As contagens, para o leite B, foram todas abaixo de 10 mil, sendo 80% abaixo de 1 mil. Já o leite C apresentou algumas contagens bastante altas, denotando possível recontaminações maciças após a pasteurização. Cerca de 54% das amostras apresentam contagens acima de 10 mil. Contagens nesta ordem indicam uma curta vida útil do produto,

principalmente em condições de refrigeração precária. Daí a grande importância dos microrganismos psicrotróficos.

#### Aplicação do Método 21°C/25 hr

Tendo em vista que o método padrão, recomendado para contagens de microrganismos psicrotróficos, baseia-se na incubação das placas a 7°C por um período de 10 dias, é fácil entender o pouco valor prático deste método no controle microbiológico do leite, tanto cru como pasteurizado. Por serem os psicrotróficos, o grupo de microrganismos mais importantes no leite e derivados, armazenados sob refrigeração, tem havido um grande interesse dos pesquisadores no sentido de desenvolver um método mais rápido, o qual possa ser aplicado rotineiramente. Oliveira (17) desenvolveu, recentemente, um novo método que permite determinar os microrganismos psicrotróficos utilizando incubação a 21°C por 25 horas. Este método ainda carece de resultados confirmatórios, por isso o presente trabalho analisou um total de 60 amostras de leite cru e 70 de pasteurizado, utilizando o novo método em comparação com o padrão.

As Figuras 1 e 2 mostram uma comparação dos resultados obtidos com amostras de leite cru e pasteurizado, respectivamente. Cada ponto nos gráficos foi obtido utilizando como coordenador os logaritmos das contagens pelo novo método e pelo método padrão. A transformação das contagens em logaritmos na base 10, foi feita com a finalidade de uniformizar os valores numéricos (resultados originais apresentados no Quadro 3, Apêndice).

A reta que passa pelos pontos, forma um ângulo de 45°

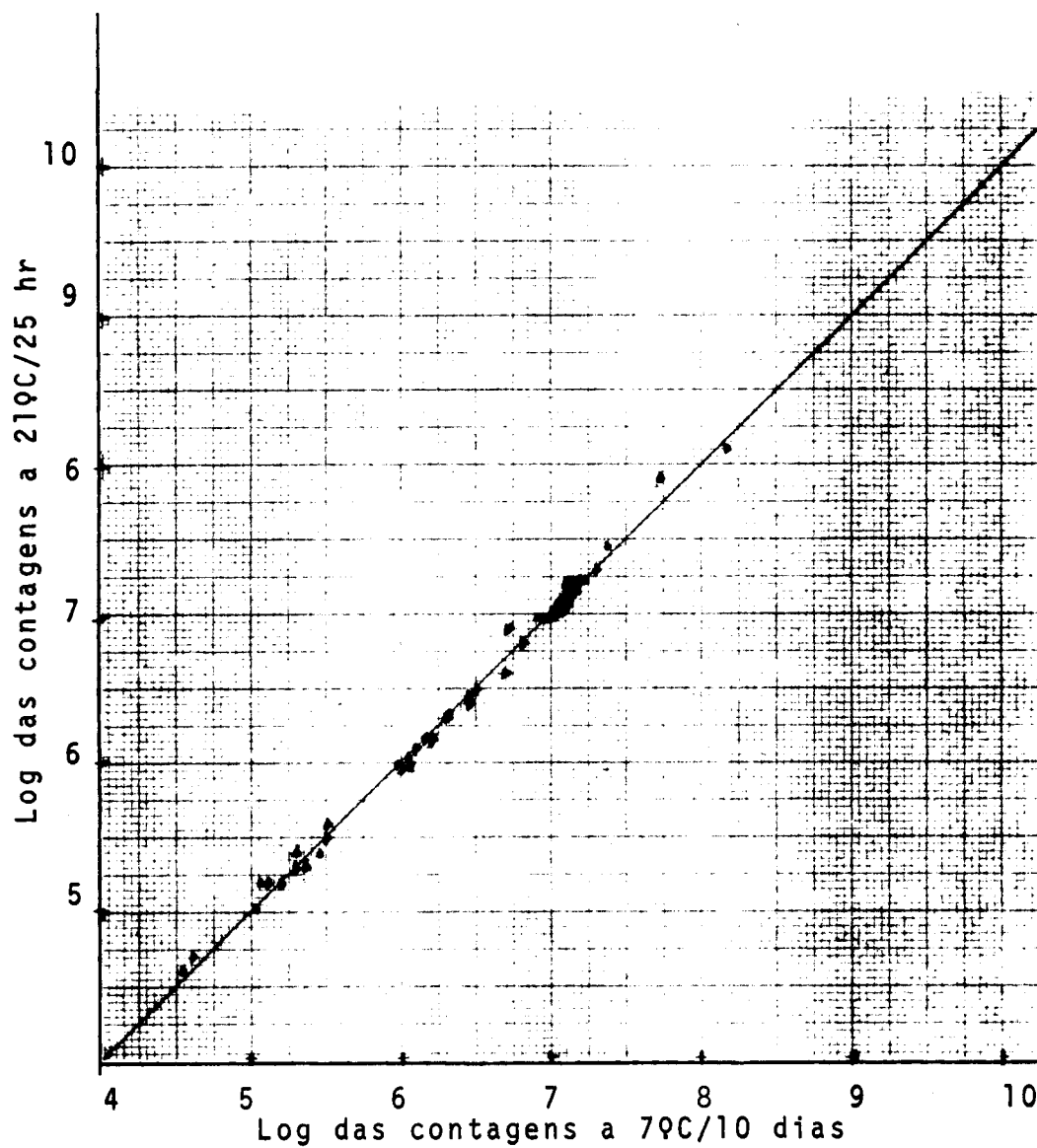


Figura 1. Comparação gráfica das contagens de psicrotróficos em 60 amostras de leite cru, utilizando o método padrão a 7°C/10 dias e o novo método a 21°C/25 hr.

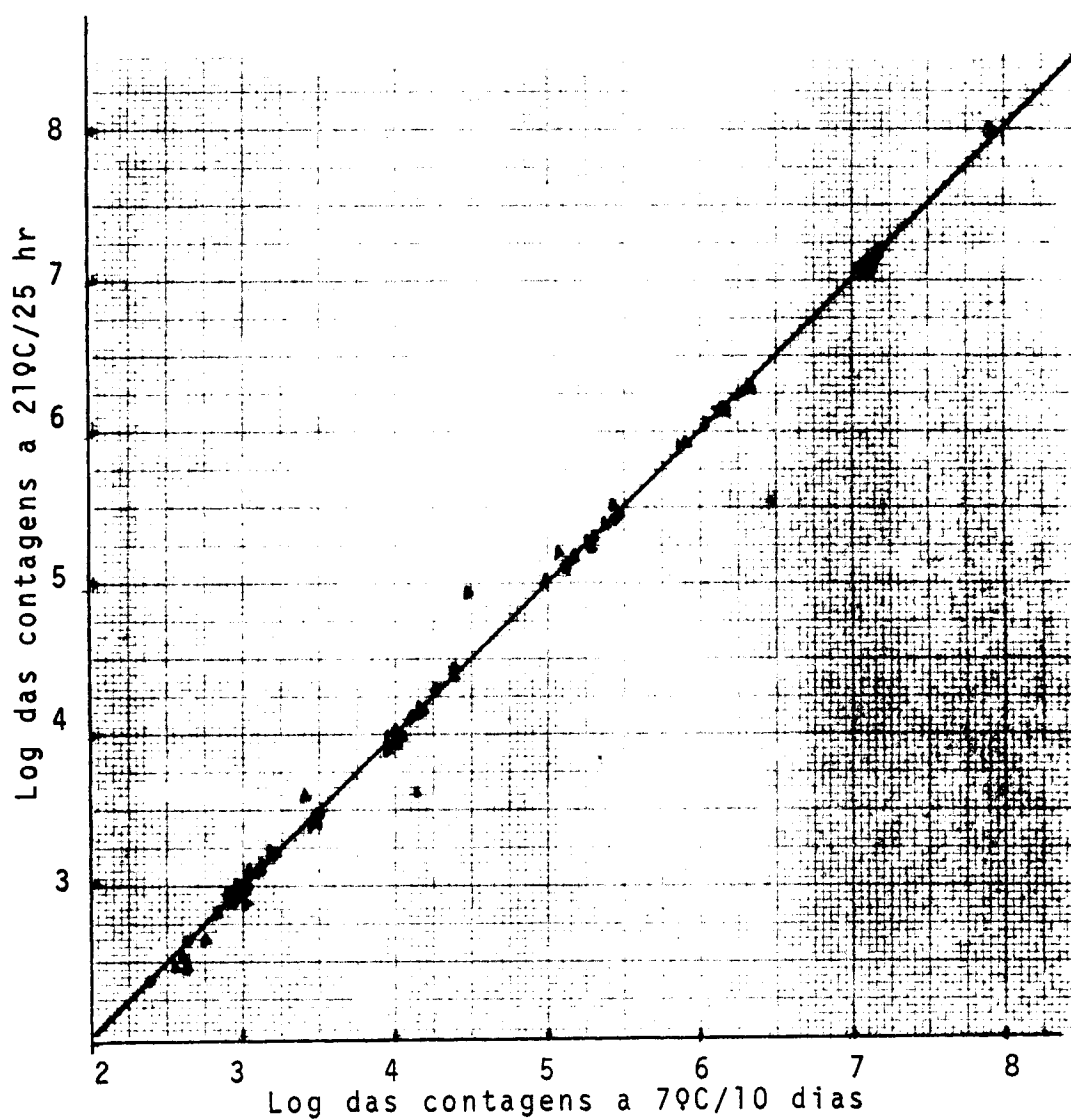


Figura 2. Comparação gráfica das contagens de psicrotrô-  
ficos em 70 amostras de leite pasteurizado,  
utilizando o método padrão a 7°C/10 dias e o  
novo método a 21°C/25 hr.

com os eixos e foi assim traçada a fim de dar uma indicação, não só da correlação, mas também da identidade entre os dois métodos. Como pode ser verificado, a maioria dos pontos estão sobre, ou muito próximo, da reta de 45º, indicando uma ótima concordância dos resultados obtidos com o novo método e com o método padrão. Os coeficientes de correlação "r", foram iguais a 0,98 e 0,99, para as amostras de leite cru e pasteurizado respectivamente. Isto confirma a estreita correlação entre os dois métodos, indicando assim, a grande importância do novo método, em vista das contagens serem obtidas em apenas 25 horas em vez de 10 dias.

Como foi bastante enfatizado na revisão da literatura, o grupo de microrganismos psicrotróficos alcança, cada vez mais, maior importância devido ao emprego constante da refrigeração como única forma de conservar o leite. Foi também verificado, no presente trabalho, que sua importância é, praticamente, da mesma magnitude que os mesófilos totais. Portanto um método que permite determinar este grupo de microrganismos em apenas 25 horas, utilizando uma técnica comum, apresenta uma grande perspectiva de utilidade prática no controle microbiológico do leite na indústria.

#### Obtenção da Contagem Total Aproveitando o Novo Método para Psicrotróficos

Em muitos casos na prática, a contagem total é desejável a fim de se ter uma idéia do número de contaminantes existentes no produto. O método padrão para contagem total recomenda uma incubação a 32ºC durante 48 horas (1).

Segundo os resultados de Oliveira (17), foi possível aproveitar as mesmas placas, utilizadas para obtenção da contagem de psicrotróficos pelo novo método (21°C/25hr) e re-incubá-las a 32°C por mais 23 horas, obtendo assim, contagens muito próximas das contagens totais obtida pelo método padrão.

Um total de 60 amostras de leite cru e 72 de pasteurizado, foram utilizadas na comparação de contagens totais obtidas utilizando a nova adaptação (incubação a 21°C por 25 hr mais 23 hr a 32°C) e o método padrão. Os resultados estão apresentados nas Figuras 3 e 4, construídas a partir dos logaritmos das contagens, conforme já descrito (resultados originais no Quadro 4, Apêndice).

Como pode ser verificado pela distribuição dos pontos, houve uma ótima concordância entre as contagens obtidas pelos dois métodos, apresentando coeficientes de correlação "r", iguais a 0,98.

Além do aproveitamento das mesmas placas para obtenção de duas contagens importantes, foi verificado também, que amostras de leite refrigerado, com predominância de psicrotróficos, em geral, apresentavam contagens mais elevadas pelo novo sistema de incubação. Isto pode ser, facilmente, explicado devido ao fato de que certos microrganismos psicrotróficos não são capazes de crescer a 32°C, porém têm condições de crescer na primeira fase de incubação a 21°C, quando se utiliza o novo sistema (21°C/25hr mais 32°C/23hr). Na segunda fase de incubação a 32°C, os microrganismos mesófilos têm condições ideais para crescer e com isto, obtemos uma contagem em que praticamente todos os psicrotróficos e mesófilos são incluídos. Isto

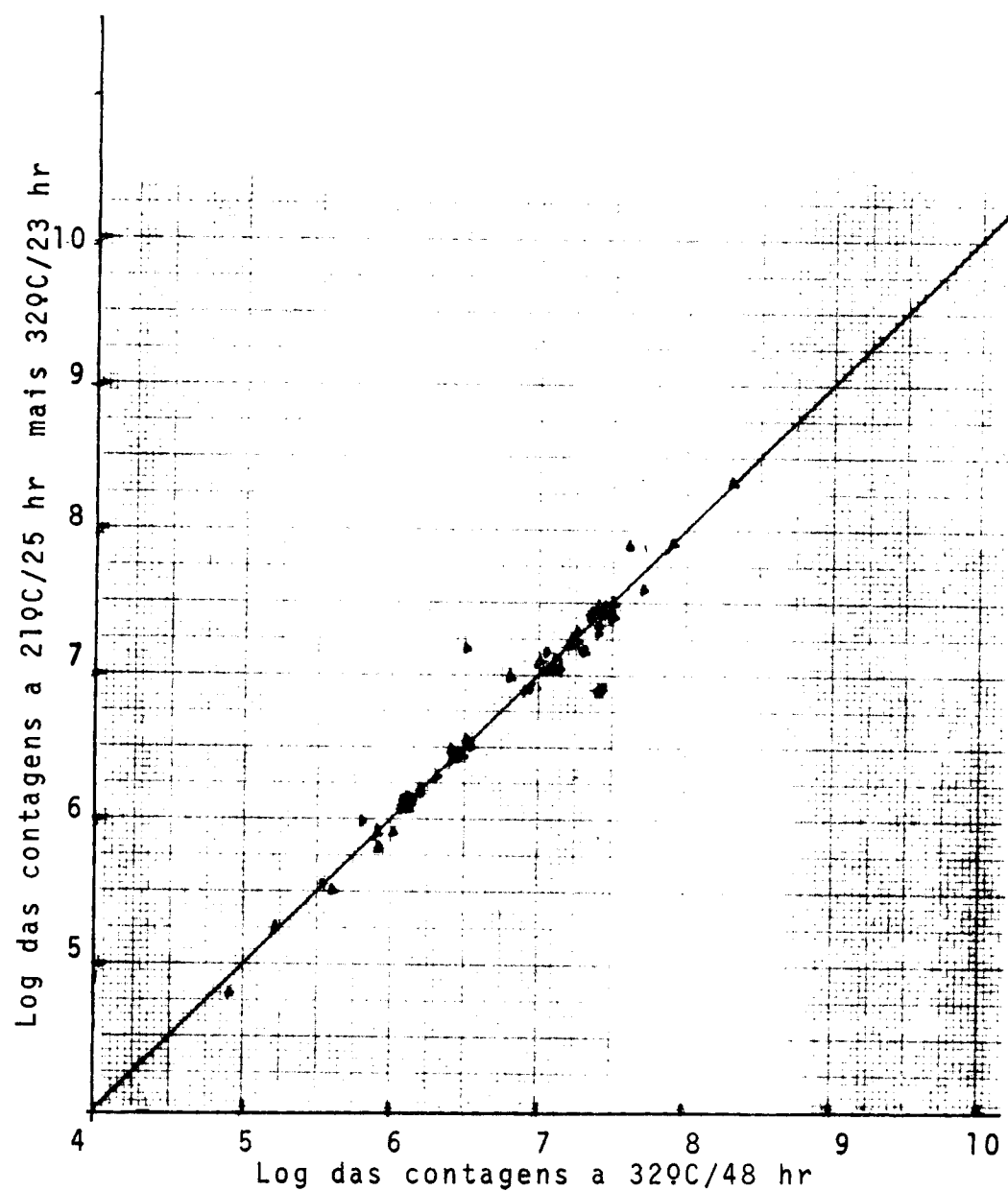


Figura 3. Comparação gráfica das contagens totais em 60 amostras de leite cru, utilizando o método padrão a 32°C/48 hr e a nova adaptação a 21°C/25 hr mais 32°C/23 hr.

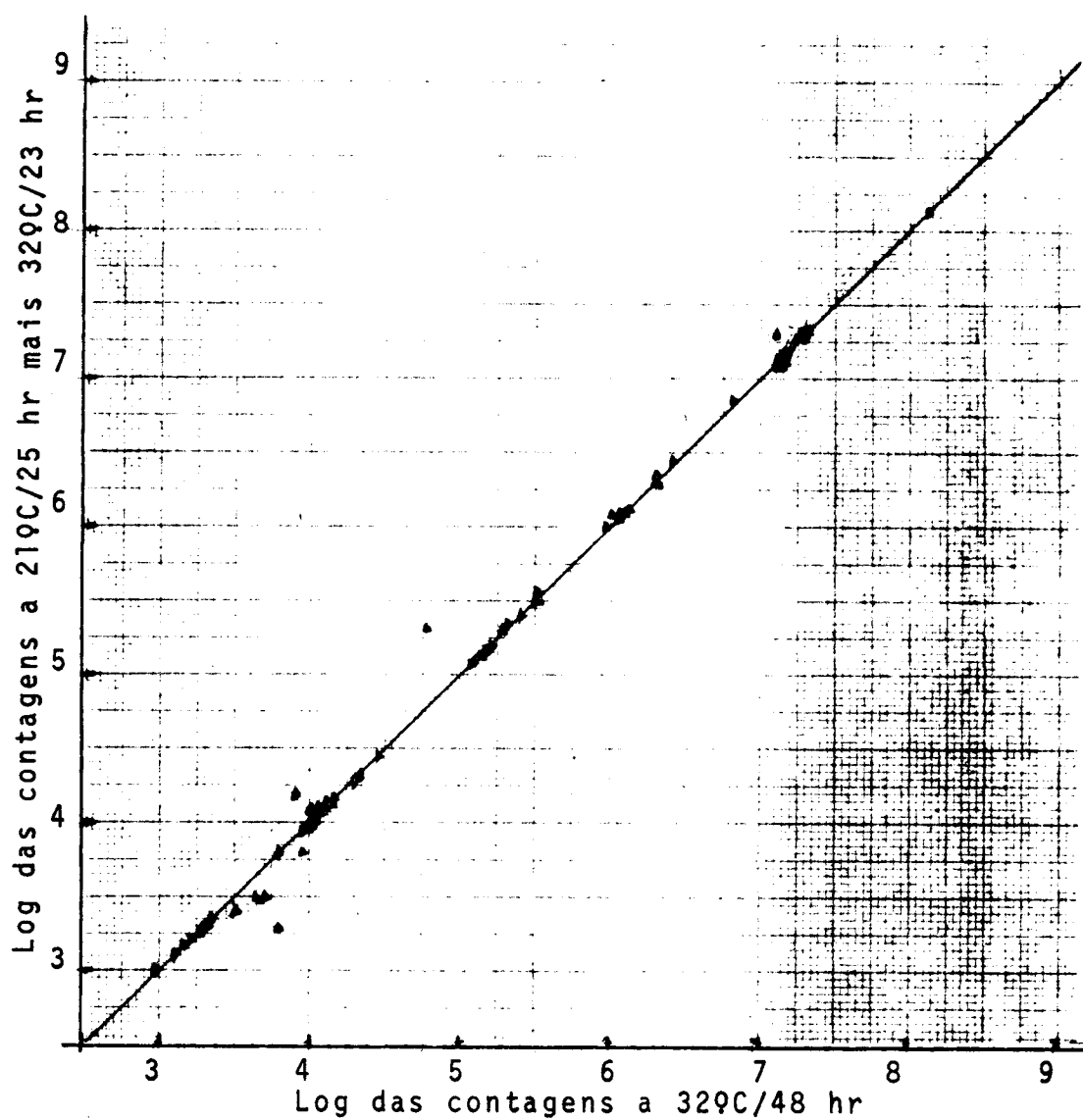


Figura 4. Comparação gráfica das contagens totais em 72 horas de leite pasteurizado, utilizando o método padrão a 32°C/48 hr e a nova adaptação a 21°C/25 hr mais 32°C/23 hr.

oferece uma grande possibilidade de resolver o problema que es  
tão enfrentando os microbiologistas, dos Estados Unidos princi  
palmente (15), na determinação de condições de incubação para  
tornar o método padrão para contagem total mais eficiente, quan  
do empregado na contagem de leite refrigerado por períodos, re  
lativamente, longos.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram formular as seguintes conclusões:

1. O novo método para contagem de psicrotróficos, que utiliza incubação a 21°C por 25 hr, funciona muito bem tanto para amostras de leite cru como pasteurizado. Podendo, portanto, substituir o método padrão com grandes vantagens com relação ao tempo de incubação.
2. O aproveitamento das placas utilizadas na contagem de psicrotróficos pelo método 21°C/25 hr, para obter a contagem total após uma incubação adicional a 32°C/23 hr, deu ótimos resultados, permitindo assim, uma economia de mão de obra e material, quando se deseja as duas contagens.
3. Em nossas condições, os microrganismos psicrotróficos revelaram-se tão importantes, numericamente, quanto os microrganismos mesófilos, apesar do emprego da refrigeração ainda não ser tão generalizado.

## REFERÊNCIAS

1. American Public Health Association (APHA). 1972. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 13th ed. American Public Health Association, Inc., New York, N.Y.
2. Baumann, D.P. and Reinbold, G.W. 1963. Enumeration of psychrophilic microorganisms. A review. J. Milk Food Technol. 26:81.
3. Baumann, D.P. and Reinbold, G.N. 1963. The enumeration of psychrophilic microorganisms in dairy products. J. Milk Food Technol. 26:351.
4. Chung, B.H. and Cannon, R.Y. 1971. Psychrotrophic sporeforming bacteria in raw milk supplies. J. Dairy Sci. 54: 448.
5. Eddy, B.P. 1960. The use of the term "psychrophilic" J. appl. Bacteriol. 23: 189.
6. Foster, E.M.; Nelson, F.G.; Speck, M.L.; Doestesch, R.N. & Olson Jr., J.C. 1957. Dairy Microbiology. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J., 492p.
7. Greene, V.W. and Jezeski, J.J. 1954. Influence of temperature on the development of several psychrophilic bacteria of dairy origin. Appl. Microbiol. 2:110.
8. Grosskopf, J.C. and Harper, N.J. 1969. Role of psychrophilic sporeformers in long life milk. J. Dairy Sci. 52: 897.
9. Johns, C.K. 1971. Bacteriological testing of milk for regulatory purposes-usefulness of current procedures and recommendations for change. J. Milk Food Technol. 34:173.
10. Juffs, H.S. 1970. A four-day count for psychrotrophs. Aust. J. Dairy Technol. 25:30.
11. Leesment, H. and Dufeu, J. 1962. A rapid method for determining the psychrophilic count in milk. Proc. XVI Int. Dairy Congr. C: 392.
12. Luck, H. 1972. Bacteriological quality testes for bulk-cooled milk. A review. Dairy Sci. Abst. 34: 101.
13. Macaulay, D.M.; Hawirko, R.Z. and James, N. 1963. Effect of pasteurization on survival of certain psychrophilic bacteria. Appl. Microbiol. 11:90.

14. Machado, E.S.V. 1975. Flora dominante do leite cru e pasteurizado. Tese de Mestrado. Fac. de Tec. de Alimentos, UNICAMP. Campinas, S.P.
15. Marth, E.H. 1975. Proposals Requested to study Methods for Analysis of Milk and Milk Products. J. Food and Milk Technol. 36: 113.
16. Ministério da Agricultura, 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Serviço de Informação Agrícola, Brasília, D.F.
17. Oliveira, J.S. 1973. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. Tese Ph.D. Purdue University. UNICAMP. (Biblioteca) F.T.A. Campinas, S.P.
18. Olson, H.C. 1961. Selective media for detecting spoilage organisms in dairy products. J. Dairy Sci. 44: 970.
19. Patel, G.B. and Blakenagel, G. 1972. Bacterial counts of raw milk and flavor of the milk after pasteurization and storage. J. Milk Food Technol. 35: 203.
20. Pinheiro, A.J.R.; Liska, B.J. and Parmelee, C.E. 1965. Heat stability of lipases of selected psychrophilic bacteria in milk and Purdue Swiss Type Cheese. J. Dairy Sci. 48: 983.
21. Shehata, T.E. and Collins, E.B. 1971. Isolation and identification of psychrophilic species of Bacillus from mil. Appl. Microbiol. 21:466.
22. Thomas, S.B. 1969. Methods of assessing the psychrotrophic bacterial content of milk. A review. J. appl. Bacteriol 32: 269.
23. Thomas, S.B. and Druce, R.G. 1969. Psychrotrophic bacteria refrigerated pasteurized milk. A review. Dairy Ind. 34: 351, 430 and 501.
24. Waes, G. 1966. Some observations on the enumeration of psychrotrophic bacteria in milk. Milchwissenschaft 21: 282.
25. Witter, L.D. 1961. Psychrophilic Bacteria. A Review. J. Dairy Sci. 44: 983.

## APÊNDICE

Quadro 3. Contagens de psicorotrôficos pelo novo método e pelo método padrão, nas amostras de leite cru e pasteurizado.

| número da amostra  | 21°C/25 hr         | 7°C/10 dias        | Log<br>21°C/25 hr | Log<br>7°C/10 dias |
|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Leite cru tipo "B" |                    |                    |                   |                    |
| 1                  | $10,3 \times 10^6$ | $10,7 \times 10^6$ | 7.01              | 7.03               |
| 2                  | $1,36 \times 10^6$ | $1,45 \times 10^6$ | 6.13              | 6.16               |
| 3                  | $2,88 \times 10^6$ | $2,93 \times 10^6$ | 5.46              | 6.47               |
| 4                  | $310 \times 10^3$  | $330 \times 10^3$  | 5.49              | 5.52               |
| 5                  | $15,1 \times 10^6$ | $16 \times 10^6$   | 7.18              | 7.20               |
| 6                  | $198 \times 10^3$  | $210 \times 10^3$  | 5.30              | 5.32               |
| 7                  | $11 \times 10^6$   | $11,8 \times 10^6$ | 7.04              | 7.07               |
| 8                  | $0,92 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^6$  | 5.96              | 6.01               |
| 9                  | $1,18 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^6$  | 6.07              | 6.04               |
| 10                 | $1,09 \times 10^6$ | $0,97 \times 10^6$ | 6.04              | 5.99               |
| 11                 | $3,1 \times 10^6$  | $3,4 \times 10^6$  | 6.49              | 6.53               |
| 12                 | $2,21 \times 10^6$ | $1,96 \times 10^6$ | 6.34              | 6.29               |
| 13                 | $2,91 \times 10^6$ | $3 \times 10^6$    | 6.46              | 6.48               |
| 14                 | $9,4 \times 10^6$  | $10,3 \times 10^6$ | 6.97              | 7.01               |
| 15                 | $10,1 \times 10^6$ | $9,7 \times 10^6$  | 7.00              | 6.99               |

## Quadro 3. Cont.

|    |                    |                    |      |      |
|----|--------------------|--------------------|------|------|
| 16 | $11,5 \times 10^6$ | $12,1 \times 10^6$ | 7.06 | 7.08 |
| 17 | $42 \times 10^3$   | $36 \times 10^3$   | 4.62 | 4.56 |
| 18 | $57 \times 10^3$   | $40 \times 10^3$   | 4.76 | 4.60 |
| 19 | $270 \times 10^3$  | $300 \times 10^3$  | 5.43 | 5.48 |
| 20 | $400 \times 10^3$  | $330 \times 10^3$  | 5.60 | 5.52 |
| 21 | $110 \times 10^3$  | $103 \times 10^3$  | 5.04 | 5.01 |
| 22 | $160 \times 10^3$  | $156 \times 10^3$  | 5.20 | 5.19 |
| 23 | $143 \times 10^3$  | $158 \times 10^3$  | 5.16 | 5.20 |
| 24 | $171 \times 10^3$  | $162 \times 10^3$  | 5.23 | 5.21 |
| 25 | $0,98 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^6$  | 5.99 | 6.04 |
| 26 | $1,82 \times 10^6$ | $1,91 \times 10^6$ | 6.26 | 6.28 |
| 27 | $2.51 \times 10^6$ | $2,59 \times 10^6$ | 6.40 | 6.41 |
| 28 | $288 \times 10^3$  | $219 \times 10^3$  | 5.46 | 5.34 |

## Leite cru tipo "C"

|    |                    |                    |      |      |
|----|--------------------|--------------------|------|------|
| 1  | $64 \times 10^6$   | $54 \times 10^6$   | 7.09 | 7.73 |
| 2  | $6.3 \times 10^6$  | $6 \times 10^6$    | 6.80 | 6.78 |
| 3  | $14,2 \times 10^6$ | $14,7 \times 10^6$ | 7.15 | 7.17 |
| 4  | $4,4 \times 10^6$  | $5 \times 10^6$    | 6.64 | 6.70 |
| 5  | $17 \times 10^6$   | $16,3 \times 10^6$ | 7.23 | 7.21 |
| 6  | $20,6 \times 10^6$ | $19,8 \times 10^6$ | 7.31 | 7.30 |
| 7  | $35 \times 10^6$   | $40 \times 10^6$   | 7.54 | 7.60 |
| 8  | $13,2 \times 10^6$ | $12,5 \times 10^6$ | 7.12 | 7.10 |
| 9  | $1,21 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^6$  | 6.08 | 6.11 |
| 10 | $1,5 \times 10^6$  | $1,61 \times 10^6$ | 6.18 | 6.21 |
| 11 | $2,1 \times 10^6$  | $2,21 \times 10^6$ | 6.32 | 6.34 |
| 12 | $210 \times 10^3$  | $222 \times 10^3$  | 5.32 | 5.35 |

Quadro 3. Cont.

|    |                    |                    |      |      |
|----|--------------------|--------------------|------|------|
| 13 | $11,6 \times 10^6$ | $12,6 \times 10^6$ | 7.06 | 7.10 |
| 14 | $15,8 \times 10^6$ | $14 \times 10^6$   | 7.20 | 7.15 |
| 15 | $29,2 \times 10^6$ | $23 \times 10^6$   | 7.47 | 7.36 |
| 16 | $14,6 \times 10^6$ | $13,2 \times 10^6$ | 7.16 | 7.12 |
| 17 | $11,7 \times 10^6$ | $12,4 \times 10^6$ | 7.07 | 7.09 |
| 18 | $9,9 \times 10^6$  | $9,2 \times 10^6$  | 7.00 | 6.96 |
| 19 | $14,5 \times 10^6$ | $13,8 \times 10^6$ | 7.16 | 7.14 |
| 20 | $17 \times 10^6$   | $17,8 \times 10^6$ | 7.26 | 7.25 |
| 21 | $9,7 \times 10^6$  | $7,9 \times 10^6$  | 6.99 | 6.90 |
| 22 | $11 \times 10^6$   | $8,5 \times 10^6$  | 7.04 | 6.93 |
| 23 | $8,6 \times 10^6$  | $5,4 \times 10^6$  | 6.94 | 6.73 |
| 24 | $8,2 \times 10^6$  | $6,1 \times 10^6$  | 6.91 | 6.79 |
| 25 | $8,3 \times 10^6$  | $7,9 \times 10^6$  | 6.92 | 6.90 |
| 26 | $14,2 \times 10^6$ | $14,7 \times 10^6$ | 7.15 | 7.17 |
| 27 | $9,7 \times 10^6$  | $10,1 \times 10^6$ | 6.99 | 7.00 |
| 28 | $19,2 \times 10^6$ | $18,5 \times 10^6$ | 7.28 | 7.27 |
| 29 | $21 \times 10^6$   | $24,5 \times 10^6$ | 7.32 | 7.39 |
| 30 | $12,5 \times 10^6$ | $7,6 \times 10^6$  | 7.10 | 7.02 |
| 31 | $131 \times 10^6$  | $147 \times 10^6$  | 8.12 | 8.17 |
| 32 | $15,2 \times 10^6$ | $12,1 \times 10^6$ | 7.18 | 7.08 |

## Leite pasteurizado tipo "B"

|   |                  |                  |      |      |
|---|------------------|------------------|------|------|
| 1 | $35 \times 10^1$ | $40 \times 10^1$ | 2.54 | 2.60 |
| 2 | $31 \times 10^1$ | $35 \times 10^1$ | 2.49 | 2.54 |
| 3 | $87 \times 10^1$ | $96 \times 10^1$ | 2.94 | 2.98 |
| 4 | $96 \times 10^1$ | $99 \times 10^1$ | 2.98 | 2.94 |
| 5 | $76 \times 10^1$ | $76 \times 10^1$ | 2.88 | 2.85 |

Quadro 3. Cont.

|    |                    |                    |      |      |
|----|--------------------|--------------------|------|------|
| 6  | $99 \times 10^1$   | $82 \times 10^1$   | 3.00 | 2.91 |
| 7  | $107 \times 10^1$  | $96 \times 10^1$   | 3.03 | 2.98 |
| 8  | $97 \times 10^1$   | $91 \times 10^1$   | 2.99 | 2.96 |
| 9  | $185 \times 10^1$  | $175 \times 10^1$  | 3.27 | 3.24 |
| 10 | $126 \times 10^1$  | $129 \times 10^1$  | 3.10 | 3.11 |
| 11 | $39 \times 10^1$   | $44 \times 10^1$   | 2.59 | 2.64 |
| 12 | $45 \times 10^1$   | $57 \times 10^1$   | 2.65 | 2.76 |
| 13 | $91 \times 10^2$   | $102 \times 10^2$  | 3.96 | 4.01 |
| 14 | $11 \times 10^3$   | $11,9 \times 10^3$ | 4.04 | 4.08 |
| 15 | $92 \times 10^1$   | $80 \times 10^1$   | 2.96 | 2.90 |
| 16 | $1,31 \times 10^3$ | $1,1 \times 10^3$  | 3.12 | 3.04 |
| 17 | $1,11 \times 10^3$ | $0,99 \times 10^3$ | 3.05 | 3.00 |
| 18 | $1,02 \times 10^3$ | $0,83 \times 10^3$ | 3.01 | 2.92 |
| 19 | $14,9 \times 10^3$ | $15,2 \times 10^3$ | 4.17 | 4.18 |
| 20 | $9,8 \times 10^3$  | $10,4 \times 10^3$ | 3.99 | 4.02 |
| 21 | $38 \times 10^3$   | $31 \times 10^3$   | 4.98 | 4.49 |
| 22 | $3,5 \times 10^6$  | $3 \times 10^6$    | 5.54 | 6.47 |
| 23 | $320 \times 10^3$  | $280 \times 10^3$  | 5.51 | 5.45 |
| 24 | $1,51 \times 10^6$ | $1,44 \times 10^6$ | 6.18 | 6.16 |
| 25 | $13,8 \times 10^3$ | $13,1 \times 10^3$ | 4.14 | 4.12 |
| 26 | $13 \times 10^3$   | $12,2 \times 10^3$ | 4.11 | 4.09 |
| 27 | $1,53 \times 10^3$ | $1,41 \times 10^3$ | 3.18 | 3.15 |
| 28 | $1,76 \times 10^3$ | $1,53 \times 10^3$ | 3.25 | 3.18 |
| 29 | $9,6 \times 10^3$  | $8,9 \times 10^3$  | 3.98 | 3.95 |
| 30 | $8,2 \times 10^3$  | $9 \times 10^3$    | 3.91 | 3.95 |
| 31 | $110 \times 10^3$  | $99 \times 10^3$   | 5.04 | 5.00 |

## Quadro 3. Cont.

|    |                    |                    |      |      |
|----|--------------------|--------------------|------|------|
| 32 | $28,4 \times 10^3$ | $24,1 \times 10^3$ | 4.45 | 4.38 |
| 33 | $31 \times 10^3$   | $26 \times 10^3$   | 4.49 | 4.42 |

## Leite pasteurizado tipo "C"

|    |                    |                    |      |      |
|----|--------------------|--------------------|------|------|
| 1  | $4,2 \times 10^3$  | $13,9 \times 10^3$ | 3.62 | 4.14 |
| 2  | $30 \times 10^1$   | $31 \times 10^1$   | 2.48 | 2.49 |
| 3  | $45 \times 10^1$   | $38 \times 10^1$   | 2.65 | 2.58 |
| 4  | $2,91 \times 10^3$ | $2.86 \times 10^3$ | 3.46 | 3.46 |
| 5  | $2.83 \times 10^3$ | $2.78 \times 10^3$ | 3.45 | 3.44 |
| 6  | $3,1 \times 10^3$  | $3 \times 10^3$    | 3.49 | 3.48 |
| 7  | $2,9 \times 10^3$  | $3,1 \times 10^3$  | 3.46 | 3.49 |
| 8  | $17,6 \times 10^3$ | $14,2 \times 10^3$ | 4.25 | 4.15 |
| 9  | $20,1 \times 10^3$ | $18,9 \times 10^3$ | 4.30 | 4.28 |
| 10 | $1,63 \times 10^3$ | $121 \times 10^3$  | 5.21 | 5.08 |
| 11 | $152 \times 10^3$  | $132 \times 10^3$  | 5.18 | 5.12 |
| 12 | $1,32 \times 10^6$ | $1,41 \times 10^6$ | 6.12 | 6.15 |
| 13 | $1,15 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^6$  | 6.06 | 6.03 |
| 14 | $195 \times 10^3$  | $187 \times 10^3$  | 5.29 | 5.27 |
| 15 | $300 \times 10^3$  | $330 \times 10^3$  | 5.48 | 5.52 |
| 16 | $187 \times 10^3$  | $193 \times 10^3$  | 5.27 | 5.28 |
| 17 | $146 \times 10^3$  | $154 \times 10^3$  | 5.16 | 5.19 |
| 18 | $197 \times 10^3$  | $174 \times 10^3$  | 5.29 | 5.24 |
| 19 | $257 \times 10^3$  | $232 \times 10^3$  | 5.41 | 5.37 |
| 20 | $860 \times 10^3$  | $800 \times 10^3$  | 5.93 | 5.90 |
| 21 | $970 \times 10^3$  | $710 \times 10^3$  | 5.90 | 5.85 |
| 22 | $11,8 \times 10^6$ | $12,4 \times 10^6$ | 7.07 | 7.09 |
| 23 | $10,3 \times 10^6$ | $12,9 \times 10^6$ | 7.01 | 7.11 |

Quadro 3. Cont.

|    |                    |                    |      |      |
|----|--------------------|--------------------|------|------|
| 24 | $8 \times 10^3$    | $8,9 \times 10^3$  | 3.90 | 3.95 |
| 25 | $132 \times 10^3$  | $126 \times 10^3$  | 5.12 | 5.10 |
| 26 | $1,87 \times 10^6$ | $1,79 \times 10^6$ | 6.27 | 6.25 |
| 27 | $1,99 \times 10^6$ | $1,91 \times 10^6$ | 6.30 | 6.28 |
| 28 | $131 \times 10^6$  | $14,1 \times 10^6$ | 7.11 | 7.15 |
| 29 | $15,6 \times 10^6$ | $14,9 \times 10^6$ | 7.19 | 7.17 |
| 30 | $14,1 \times 10^6$ | $15,7 \times 10^6$ | 7.15 | 7.10 |
| 31 | $11,7 \times 10^6$ | $12,6 \times 10^6$ | 7.07 | 7.10 |
| 32 | $205 \times 10^3$  | $189 \times 10^3$  | 4.31 | 5.28 |
| 33 | $298 \times 10^3$  | $286 \times 10^3$  | 5.47 | 5.44 |
| 34 | $14,9 \times 10^6$ | $15,7 \times 10^6$ | 7.17 | 7.20 |
| 35 | $16,2 \times 10^6$ | $17,4 \times 10^6$ | 7.21 | 7.24 |
| 36 | $22,1 \times 10^6$ | $20,6 \times 10^6$ | 7.34 | 7.31 |
| 37 | $101 \times 10^6$  | $95 \times 10^6$   | 8.00 | 7.98 |

---

Quadro 4. Contagens totais nas amostras de leite cru e pasteurizado, utilizando o novo método e o método padrão.

| número<br>da<br>amostra | 32°C/48 hr        | 21°C/25 hr<br>e<br>32°C/23 hr | Log<br>32°C/48 hr | Log<br>21°C/25 hr<br>e<br>32°C/23 hr |
|-------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Leite cru tipo "B"      |                   |                               |                   |                                      |
| 1                       | $75 \times 10^4$  | $104 \times 10^4$             | 5.88              | 6.02                                 |
| 2                       | $238 \times 10^4$ | $263 \times 10^4$             | 6.38              | 6.42                                 |
| 3                       | $35 \times 10^5$  | $32 \times 10^5$              | 6.54              | 6.51                                 |
| 4                       | $29 \times 10^5$  | $29 \times 10^5$              | 6.46              | 6.46                                 |
| 5                       | $290 \times 10^4$ | $265 \times 10^4$             | 6.46              | 6.42                                 |
| 6                       | $92 \times 10^6$  | $82 \times 10^6$              | 7.96              | 7.91                                 |
| 7                       | $68 \times 10^5$  | $121 \times 10^5$             | 6.83              | 7.08                                 |
| 8                       | $273 \times 10^5$ | $238 \times 10^5$             | 7.47              | 7.38                                 |
| 9                       | $31 \times 10^5$  | $31 \times 10^5$              | 6.49              | 6.49                                 |
| 10                      | $230 \times 10^4$ | $209 \times 10^4$             | 6.36              | 6.32                                 |
| 11                      | $129 \times 10^4$ | $137 \times 10^4$             | 6.11              | 6.14                                 |
| 12                      | $168 \times 10^4$ | $152 \times 10^4$             | 6.23              | 6.18                                 |
| 13                      | $199 \times 10^5$ | $207 \times 10^5$             | 7.30              | 7.32                                 |
| 14                      | $183 \times 10^5$ | $188 \times 10^5$             | 7.26              | 7.27                                 |
| 15                      | $144 \times 10^5$ | $120 \times 10^5$             | 7.07              | 7.08                                 |
| 16                      | $298 \times 10^5$ | $295 \times 10^5$             | 7.47              | 7.47                                 |
| 17                      | $276 \times 10^5$ | $269 \times 10^5$             | 7.44              | 7.43                                 |
| 18                      | $283 \times 10^5$ | $289 \times 10^5$             | 7.45              | 7.46                                 |
| 19                      | $78 \times 10^3$  | $65 \times 10^3$              | 4.89              | 4.81                                 |
| 20                      | $172 \times 10^3$ | $181 \times 10^3$             | 5.24              | 5.26                                 |
| 21                      | $33 \times 10^4$  | $37 \times 10^4$              | 5.52              | 5.57                                 |
| 22                      | $75 \times 10^4$  | $81 \times 10^4$              | 5.88              | 5.91                                 |

Quadro 4. Cont.

|    |                   |                   |      |      |
|----|-------------------|-------------------|------|------|
| 23 | $131 \times 10^4$ | $142 \times 10^4$ | 6.12 | 6.15 |
| 24 | $140 \times 10^4$ | $132 \times 10^4$ | 6.15 | 6.12 |
| 25 | $126 \times 10^4$ | $134 \times 10^4$ | 6.10 | 6.13 |
| 26 | $165 \times 10^4$ | $170 \times 10^4$ | 6.22 | 6.23 |
| 27 | $136 \times 10^4$ | $121 \times 10^4$ | 6.13 | 6.08 |
| 28 | $173 \times 10^5$ | $181 \times 10^5$ | 7.24 | 7.26 |
| 29 | $103 \times 10^5$ | $98 \times 10^5$  | 7.01 | 6.99 |
| 30 | $39 \times 10^4$  | $31 \times 10^4$  | 5.59 | 5.49 |

## Leite cru tipo "C"

|    |                   |                   |      |      |
|----|-------------------|-------------------|------|------|
| 1  | $59 \times 10^4$  | $93 \times 10^4$  | 5.77 | 5.97 |
| 2  | $27 \times 10^5$  | $33 \times 10^5$  | 6.43 | 6.52 |
| 3  | $131 \times 10^4$ | $130 \times 10^4$ | 6.12 | 6.11 |
| 4  | $106 \times 10^5$ | $105 \times 10^3$ | 7.03 | 7.02 |
| 5  | $177 \times 10^5$ | $214 \times 10^5$ | 7.25 | 7.33 |
| 6  | $38 \times 10^5$  | $53 \times 10^5$  | 6.58 | 6.72 |
| 7  | $41 \times 10^6$  | $39 \times 10^6$  | 7.61 | 7.96 |
| 8  | $57 \times 10^5$  | $41 \times 10^5$  | 7.76 | 7.61 |
| 9  | $237 \times 10^5$ | $237 \times 10^5$ | 7.37 | 7.37 |
| 10 | $156 \times 10^6$ | $154 \times 10^5$ | 8.19 | 7.19 |
| 11 | $134 \times 10^5$ | $124 \times 10^5$ | 7.13 | 7.09 |
| 12 | $191 \times 10^5$ | $190 \times 10^5$ | 7.28 | 7.28 |
| 13 | $32 \times 10^6$  | $29 \times 10^6$  | 7.51 | 7.46 |
| 14 | $282 \times 10^5$ | $297 \times 10^5$ | 7.45 | 7.47 |
| 15 | $281 \times 10^5$ | $257 \times 10^5$ | 7.45 | 7.41 |
| 16 | $276 \times 10^5$ | $222 \times 10^5$ | 7.44 | 7.36 |
| 17 | $196 \times 10^5$ | $203 \times 10^5$ | 7.29 | 7.31 |

## Quadro 4. Cont.

|    |                   |                   |      |      |
|----|-------------------|-------------------|------|------|
| 18 | $241 \times 10^5$ | $250 \times 10^5$ | 7.38 | 7.40 |
| 19 | $112 \times 10^5$ | $147 \times 10^5$ | 8.05 | 7.17 |
| 20 | $177 \times 10^5$ | $202 \times 10^5$ | 7.25 | 7.31 |
| 21 | $248 \times 10^5$ | $220 \times 10^5$ | 7.39 | 7.34 |
| 22 | $256 \times 10^5$ | $297 \times 10^5$ | 7.41 | 7.47 |
| 23 | $109 \times 10^5$ | $106 \times 10^5$ | 7.04 | 7.03 |
| 24 | $177 \times 10^5$ | $184 \times 10^5$ | 7.25 | 7.26 |
| 25 | $133 \times 10^5$ | $141 \times 10^5$ | 7.12 | 7.15 |
| 26 | $262 \times 10^5$ | $271 \times 10^5$ | 7.42 | 7.43 |
| 27 | $239 \times 10^5$ | $246 \times 10^5$ | 7.38 | 7.39 |
| 28 | $176 \times 10^5$ | $181 \times 10^5$ | 7.25 | 7.26 |
| 29 | $201 \times 10^6$ | $207 \times 10^6$ | 8.30 | 8.32 |
| 30 | $114 \times 10^5$ | $142 \times 10^5$ | 7.06 | 7.15 |

## Leite pasteurizado tipo "B"

|    |                   |                   |      |      |
|----|-------------------|-------------------|------|------|
| 1  | $78 \times 10^2$  | $28 \times 10^2$  | 3.89 | 3.45 |
| 2  | $54 \times 10^2$  | $32 \times 10^2$  | 3.73 | 3.51 |
| 3  | $134 \times 10^1$ | $127 \times 10^1$ | 3.13 | 3.10 |
| 4  | $223 \times 10^1$ | $216 \times 10^1$ | 3.35 | 3.33 |
| 5  | $61 \times 10^2$  | $74 \times 10^2$  | 3.79 | 3.87 |
| 6  | $94 \times 10^1$  | $101 \times 10^1$ | 2.97 | 3.00 |
| 7  | $87 \times 10^2$  | $89 \times 10^2$  | 3.94 | 3.95 |
| 8  | $132 \times 10^2$ | $140 \times 10^2$ | 4.12 | 4.15 |
| 9  | $144 \times 10^1$ | $152 \times 10^1$ | 3.16 | 3.18 |
| 10 | $174 \times 10^1$ | $180 \times 10^1$ | 3.24 | 3.26 |
| 11 | $99 \times 10^2$  | $106 \times 10^2$ | 3.99 | 4.02 |
| 12 | $87 \times 10^2$  | $92 \times 10^2$  | 3.94 | 3.96 |

Quadro 4. Cont.

|    |                   |                   |      |      |
|----|-------------------|-------------------|------|------|
| 13 | $216 \times 10^2$ | $222 \times 10^2$ | 4.33 | 4.35 |
| 14 | $192 \times 10^1$ | $187 \times 10^1$ | 3.28 | 3.27 |
| 15 | $86 \times 10^2$  | $161 \times 10^2$ | 3.93 | 4.21 |
| 16 | $101 \times 10^2$ | $136 \times 10^2$ | 4.00 | 4.13 |
| 17 | $121 \times 10^2$ | $122 \times 10^2$ | 4.08 | 4.09 |
| 18 | $149 \times 10^3$ | $156 \times 10^3$ | 5.17 | 5.19 |
| 19 | $185 \times 10^1$ | $194 \times 10^1$ | 3.27 | 3.29 |
| 20 | $215 \times 10^1$ | $236 \times 10^1$ | 3.33 | 3.37 |
| 21 | $112 \times 10^2$ | $120 \times 10^2$ | 4.05 | 4.08 |
| 22 | $97 \times 10^2$  | $101 \times 10^2$ | 3.99 | 4.00 |
| 23 | $127 \times 10^3$ | $119 \times 10^3$ | 5.10 | 5.08 |
| 24 | $208 \times 10^2$ | $216 \times 10^2$ | 4.32 | 4.34 |
| 25 | $125 \times 10^3$ | $119 \times 10^3$ | 5.09 | 5.07 |
| 26 | $67 \times 10^5$  | $72 \times 10^5$  | 6.82 | 6.85 |
| 27 | $276 \times 10^4$ | $282 \times 10^4$ | 6.44 | 6.45 |
| 28 | $178 \times 10^5$ | $140 \times 10^5$ | 7.25 | 7.15 |
| 29 | $45 \times 10^2$  | $31 \times 10^2$  | 3.65 | 3.49 |
| 30 | $153 \times 10^2$ | $159 \times 10^2$ | 4.18 | 4.20 |
| 31 | $164 \times 10^2$ | $170 \times 10^2$ | 4.21 | 4.23 |
| 32 | $142 \times 10^2$ | $137 \times 10^2$ | 4.15 | 4.14 |
| 33 | $99 \times 10^2$  | $101 \times 10^2$ | 3.99 | 4.00 |
| 34 | $132 \times 10^2$ | $146 \times 10^2$ | 4.12 | 4.16 |
| 35 | $121 \times 10^2$ | $133 \times 10^2$ | 4.08 | 4.12 |
| 36 | $192 \times 10^3$ | $201 \times 10^3$ | 5.28 | 5.30 |
| 37 | $157 \times 10^3$ | $161 \times 10^3$ | 5.19 | 5.20 |

Quadro 4. Cont.

| Leite pasteurizado tipo C |                    |                   |      |      |
|---------------------------|--------------------|-------------------|------|------|
| 1                         | $58 \times 10^3$   | $214 \times 10^3$ | 4.76 | 5.33 |
| 2                         | $9,1 \times 10^3$  | $67 \times 10^3$  | 3.96 | 3.83 |
| 3                         | $3,7 \times 10^3$  | $29 \times 10^2$  | 3.57 | 3.46 |
| 4                         | $28,7 \times 10^3$ | $295 \times 10^2$ | 4.46 | 4.47 |
| 5                         | $11,2 \times 10^3$ | $124 \times 10^2$ | 4.05 | 4.09 |
| 6                         | $14,6 \times 10^3$ | $157 \times 10^2$ | 4.16 | 4.19 |
| 7                         | $12,7 \times 10^3$ | $137 \times 10^2$ | 4.10 | 4.12 |
| 8                         | $176 \times 10^3$  | $181 \times 10^3$ | 5.24 | 5.25 |
| 9                         | $156 \times 10^3$  | $162 \times 10^3$ | 5.19 | 5.21 |
| 10                        | $0,98 \times 10^6$ | $121 \times 10^4$ | 5.99 | 6.08 |
| 11                        | $14,7 \times 10^6$ | $130 \times 10^5$ | 7.16 | 7.11 |
| 12                        | $12,9 \times 10^6$ | $137 \times 10^5$ | 7.11 | 7.13 |
| 13                        | $110 \times 10^4$  | $115 \times 10^4$ | 6.04 | 6.06 |
| 14                        | $256 \times 10^3$  | $261 \times 10^3$ | 5.41 | 5.42 |
| 15                        | $31 \times 10^4$   | $33 \times 10^4$  | 5.49 | 5.52 |
| 16                        | $203 \times 10^4$  | $226 \times 10^4$ | 6.31 | 6.35 |
| 17                        | $199 \times 10^4$  | $201 \times 10^4$ | 6.30 | 6.30 |
| 18                        | $117 \times 10^4$  | $123 \times 10^4$ | 6.07 | 6.09 |
| 19                        | $146 \times 10^4$  | $151 \times 10^4$ | 6.16 | 6.18 |
| 20                        | $139 \times 10^5$  | $136 \times 10^5$ | 7.14 | 7.13 |
| 21                        | $124 \times 10^5$  | $116 \times 10^5$ | 7.09 | 7.06 |
| 22                        | $201 \times 10^2$  | $200 \times 10^2$ | 4.30 | 4.30 |
| 23                        | $231 \times 10^3$  | $238 \times 10^3$ | 5.36 | 5.37 |
| 24                        | $191 \times 10^5$  | $201 \times 10^5$ | 7.28 | 7.30 |
| 25                        | $203 \times 10^5$  | $198 \times 10^5$ | 7.30 | 7.29 |
| 26                        | $122 \times 10^5$  | $206 \times 10^5$ | 7.08 | 7.31 |

Quadro 4. Cont.

|    |                   |                   |      |      |
|----|-------------------|-------------------|------|------|
| 27 | $137 \times 10^5$ | $141 \times 10^5$ | 7.13 | 7.15 |
| 28 | $183 \times 10^5$ | $197 \times 10^5$ | 7.26 | 7.29 |
| 29 | $145 \times 10^5$ | $151 \times 10^5$ | 7.16 | 7.18 |
| 30 | $31 \times 10^4$  | $35 \times 10^4$  | 5.49 | 5.55 |
| 31 | $147 \times 10^4$ | $155 \times 10^4$ | 6.17 | 6.19 |
| 32 | $183 \times 10^5$ | $191 \times 10^5$ | 7.26 | 7.28 |
| 33 | $205 \times 10^5$ | $197 \times 10^5$ | 7.31 | 7.29 |
| 34 | $97 \times 10^4$  | $106 \times 10^4$ | 5.98 | 6.02 |
| 35 | $133 \times 10^6$ | $140 \times 10^6$ | 8.12 | 8.14 |

---