INFLUÊNCIA DA ESPÉCIE BACTERIANA E DA TEMPERATURA DA AMOSTRA NO TESTE DE REDUTASE PARA LEITE, COM AZUL DE METILENO E REZASURINA

SILVIA HELENA OLITTA MORATO DO AMARAL

Orientador : ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro, 1985

DEDICO

*Aos meus pais,
irmãs
e madrinha Eline.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira, pela segura orientação e mútua amizade construída na realização deste trabalho.
- Aos Profs. Dr. João Gustavo Brasil Caruso e Cláudio Rosa Gallo, pelas sugestões apresentadas e pelo marcante incentivo de amigos.
- Aos Profs. Drs. Alcides Martinelli Filho e Hércio Falanghe, pelos equipamentos cedidos.
- Aos Profs. Dr. Humberto de Campos e Cristina Stolf Nogueira pela aplicação das Análises Estatísticas.
- Aos professores e aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelo convívio saudável e pela motivação conjunta.
- Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos valiosos auxílios prestados.
- A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio concedido a partir de 1980 na forma de bolsa de estudos.
- Ao Dr. Rubismar Stolf pelo incentivo.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE GRÁFICOS	ix
RESUMO	xxi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Microrganismos mesofílicos	4
2.1.1. Coliformes	4
2.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.2. Estafilococos	6
2.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.1.3. Estreptococos	9
2.1.3.1. <i>Streptococcus agalactiae</i> ..	9
2.1.3.2. <i>Streptococcus faecalis</i> ...	10
2.1.3.3. <i>Streptococcus lactis</i>	10
2.2. Microrganismos psicrótróficos	11
2.2.1. <i>Pseudomonas</i>	14
2.2.1.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ...	14
2.3. Teste de redutase	15
2.3.1. Redução do corante	19
2.3.2. Redução do azul de metileno	20
2.3.3. Redução da rezasurina	22
2.4. Emprego do teste de redutase	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Material	30
3.1.1. Matéria prima	30
3.1.2. Microrganismos	30

	Página
3.1.3. Corantes	32
3.1.4. Soluções da Escala de McFarland	32
3.1.5. Água peptonada	32
3.2. Métodos	33
3.2.1. Escala de Mc-Farland	33
3.2.2. Preparo do inóculo	34
3.2.3. Preparo da matéria prima	35
3.2.4. Procedimento experimental	35
3.2.5. Planejamento experimental	36
Análises estatísticas	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. <i>Escherichia coli</i> IZ 923 e azul de metileno	38
4.2. <i>Escherichia coli</i> IZ 923 e rezasurina	42
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 e azul de metileno	44
4.4. <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 e rezasurina ...	47
4.5. <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 e azul de metileno	50
4.6. <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 e rezasurina .	55
4.7. <i>Streptococcus faecalis</i> ITAL e azul de metileno .	58
4.8. <i>Streptococcus faecalis</i> ITAL e rezasurina	61
4.9. <i>Streptococcus lactis</i> ITAL e azul de metileno ...	64
4.10. <i>Streptococcus lactis</i> ITAL e rezasurina	67
4.11. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ITAL e azul de metileno .	70
4.12. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ITAL e rezasurina	73
5. CONCLUSÕES	78
6. LITERATURA CITADA	80
7. APÊNDICE	90

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Tempo de redução do corante, azul de metileno - <i>Escherichia coli</i> IZ 923 (minutos).	39
02	Análise de variância do teste de resutase <i>Escherichia coli</i> IZ 923 e azul de metileno	39
03	Tempo de redução do corante, rezasurina - <i>Escherichia coli</i> IZ 923 (minutos)	43
04	Análise de variância do teste de redutase <i>Escherichia coli</i> IZ 923 e rezasurina	43
05	Tempo de redução do corante, azul de metileno - <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 (minutos)	46
06	Análise de variância do teste de redutase - <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 e azul de metileno	46
07	Tempo de redução do corante, rezasurina - <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 (minutos) .	49
08	Análise de variância do teste de redutase - <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 e rezasurina	49
09	Tempo de redução do corante, azul de metileno - <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 (minutos)	52

TABELA Nº

Página

10	Análise de variância do teste de redutase <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 e azul de metileno	52
11	Tempo de redução do corante, rezasurina - <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 (minutos)	56
12	Análise de variância do teste de redutase - <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 e rezasurina	56
13	Tempo de redução do corante, azul de metileno - <i>Streptococcus faecalis</i> ITAL (minutos)	59
14	Análise de variância do teste de redutase - <i>Streptococcus faecalis</i> ITAL e azul de metileno	59
15	Tempo de redução do corante, rezasurina - <i>Streptococcus faecalis</i> ITAL (minutos) ...	62
16	Análise de variância do teste de redutase - <i>Streptococcus faecalis</i> ITAL e rezasurina	62
17	Tempo de redução do corante, azul de metileno - <i>Streptococcus lactis</i> ITAL (minutos)	65
18	Análise de variância do teste de redutase <i>Streptococcus lactis</i> ITAL e azul de metileno .	65

TABELA Nº

Página

19	Tempo de redução do corante, rezasurina - <i>Streptococcus lactis</i> ITAL (minutos)	68
20	Análise de variância do teste de redutase <i>Streptococcus lactis</i> ITAL e rezasurina ..	68
21	Tempo de redução do corante azul de metileno - <i>Pseudomonas fluorescens</i> ITAL (minutos)	71
22.	Análise de variância do teste de redutase <i>Pseudomonas fluorescens</i> ITAL e azul de metileno	71
23	Tempo de redução do corante, rezasurina - <i>Pseudomonas fluorescens</i> ITAL (minutos) .	74
24	Análise de variância do teste de redutase <i>Pseudomonas fluorescens</i> ITAL e rezasurina	74

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO Nº		Página
01	Comportamento da <i>Escherichia coli</i> IZ 923 e azul de metileno	41
02	Comportamento da <i>Escherichia coli</i> IZ 923 e rezasurina	45
03	Comportamento do <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 e azul de metileno	48
04	Comportamento do <i>Staphylococcus aureus</i> IZ 1974 e rezasurina	51
05	Comportamento do <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 e azul de metileno	54
06	Comportamento do <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 e rezasurina	57
07	Comportamento do <i>Streptococcus faecalis</i> - ITAL e azul de metileno	60
08	Comportamento do <i>Streptococcus faecalis</i> - ITAL e rezasurina	63
09	Comportamento do <i>Streptococcus lactis</i> - ITAL e azul de metileno	66
10	Comportamento do <i>Streptococcus lactis</i> ITAL e rezasurina	69
11	Comportamento da <i>Pseudomonas fluorescens</i> ITAL e azul e metileno	72

Gráfico Nº

Página

12

Comportamento da *Pseudomonas fluorescens*
ITAL e rezasurina .....

76

INFLUÊNCIA DA ESPÉCIE BACTERIANA E DA TEMPERATURA DA AMOSTRA
NO TESTE DE REDUTASE PARA LEITE COM AZUL DE METILENO
E REZASURINA

Candidata: SILVIA HELENA OLITTA MORATO DO AMARAL

Orientador: ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

RESUMO

A influência da espécie bacteriana e da temperatura da amostra na descoloração dos corantes azul de metileno e rezasurina normalmente empregados no teste de redutase para se avaliar a população bacteriana do leite, ao chegar à plataforma da indústria, foi estudada.

Para tal foram elegidas seis culturas de microrganismos que normalmente estão presentes em leite cru, como descritos por vários autores FOSTER et alii (1957), DONNELLY (1968), BABEL (1953), MARTH & FRAZIER (1957). Essas culturas são: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens*.

As temperaturas iniciais das amostras, foram escolhidas baseando-se no uso ou não de resfriamento na propriedade e no tempo decorrido entre ordenha e recebimento do leite na plataforma. Desta forma trabalhou-se com 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 35ºC, como temperaturas iniciais das amostras.

O inóculo foi preparado de culturas puras de cada espécie de microrganismos, baseando-se na escala de McFarland, pela leitura espectrofotométrica a 420 nm, comparada com o tubo nº 4 da referida escala e que corresponde a uma população de $4,5 \times 10^8$ bactérias/ml.

Após acertada a população bacteriana inicial, 1 ml das suspensões era inoculado em 8,0 ml de leite esterelizado já ajustado à temperatura desejada em tubos de cultura com tampa de rosca. Nestes eram adicionados 1,0 ml da solução do corante e imediatamente levados à incubação em banho maria a $37^\circ \pm 0,2^\circ\text{C}$.

O tempo de redução do corante pelos microrganismos foi avaliado pela diferença do tempo de entrada da amostra no banho-maria, até a descoloração total (forma leuco), para ambos os corantes.

A análise estatística dos resultados mostrou que os microrganismos se comportaram diferentemente em relação à temperatura inicial da amostra e ao tempo de descoloração dos corantes, com variações que não permitem apontar o corante mais adequado para o teste de redutase em relação à temperatura da amostra.

**BACTERIAL SPECIE AND SAMPLE TEMPERATURE INFLUENCE ON THE
REDUCTASE TEST FOR MILK WITH METHYLENE BLUE AND REZASURINE**

Candidate: SILVIA HELENA OLITTA MORATO DO AMARAL
Adviser: ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA, Ph.D.

SUMMARY

This work was undertaken to study the influence of bacterial species and the sample temperature on the reduction of methylene blue and rezasurine dyes usually used for the reductase test, to check the milk bacterial population at its arriving at the dairy plant.

Six microorganisms species reported by many authors FOSTER et alii (1957), DONNELLY (1968), BABEL (1953), MARTH & FRAZIER (1957) as usually found in raw milk were selected. These cultures were: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens*.

The temperatures of the samples were chose based on the use or not of refrigeration of the milk at the dairy farm and on the time elapsed from milking untill the arrive of the milk at the plant. Though, the temperature of the samples were ajusted to 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º and 35ºC, before testing.

The inoculum was prepared from pure cultures of each specie of microorganism, based on the Mc Farland ' s scale, by the spectrofotometric reading of a suspension of microorganism at 420 nm, compared to the n° 4 tube of this scale, which represents a population of 4.5×10^8 bacteria /ml. The reductase test was performed by inoculating 1.0 ml of the microbial suspension prepared as previously in 8.0 ml of steril milk adjusted to the desired temperature, in screw capped tubes and addition of 1.0 ml of the dye tested. Then the tubes were immediatly put into the water-bath $37^\circ \pm 0,2^\circ\text{C}$.

The reduction time was taken as the diference between the time of mixting the dye with the sample and the complete reduction of the dye.

The statistical analyses of the results show a different behavior among the microorganism tested, as related to the initial temperature of the sample and the reduction time of the dye, the variations were such, that make it difficult to point out which dye was more adequate for the reductase test in relation to the initial temperature of the sample.

1. INTRODUÇÃO

A boa qualidade do leite destinado ao consumo é fator de suma importância, visto que o leite é considerado uma das principais fontes de nutrientes para uma grande parte da população. Seu valor está baseado fundamentalmente em seu quase perfeito balanço de nutrientes, riqueza em minerais e valor energético.

Estas características por outro lado tornam-no um dos alimentos mais susceptíveis de sofrer alterações físico-químicas e deterioração por microrganismos oriundos de diferentes fontes.

Entre os microrganismos que provocam alterações no leite, os mais importantes são as bactérias como *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, etc; os quais podem produzir azedamento ou formação de ácido, formação de gás, proteólise, aumento da viscosidade, lipólise e alteração na cor e sabor.

De excelente alimento que é, o leite pode se tornar um veículo de transmissão de doenças que são comuns aos animais e ao homem como é o caso da tuberculose, aftose, brucelose e outras.

Desta forma, torna-se de maior importância o controle do estado de saúde dos animais em ordenha, bem como a manutenção de condições de higiene as melhores possíveis durante a ordenha, beneficiamento e distribuição do leite, para que um produto de qualidade chegue ao consumidor.

A qualidade microbiológica do leite pode ser detectada por diferentes métodos, os quais envolvem técnicas mais ou menos complexas, de acordo com as necessidades da análise. Dentre esses métodos, o teste de redutase é o de maior aplicação prática sendo, segundo a portaria número 005 de 24 de abril de 1980, publicada no Diário Oficial da União, ano CXVIII, baixada pela Divisão de Inspeção de Leite e Derivados (DILEI) da Secretaria da Inspeção de Produto Animal (SIPA) do Ministério da Agricultura; "a prova da redutase do leite deve ser efetuada através do corante azul de metileno, no mínimo duas vezes por semana, por produtor, não devendo o tempo de descoloração ser inferior a duas horas e trinta minutos".

Reforçando, o Ministério da Agricultura, estabeleceu recentemente a portaria nº 06 de 7 de março de 1983, publicada no Diário Oficial da União, ano CXXI nº 49 para leite "in natura", após sua chegada ao estabelecimento recebedor do leite, torna-se obrigatório o teste de Redutase, seguindo-se

outras providências tais como: condições de higiene do veículo e do toldo; inspeção dos latões para transporte do leite; a seleção do leite pelo alizarol com mínimo de 689GL; os caracteres organolépticos do leite; a eventual aguagem através da verificação do extrato seco e prova da crioscopia; a pesquisa do colostro, pus, sangue, fervura, conservador e/ou inibidor, neutralizante, reconstituintes da densidade e lacto-filtração.

Por essa mesma portaria, torna-se também obrigatório o teste da Redutase, em leite pré-beneficiado.

A prova de redutase auxilia na seleção do leite recebido, avaliando-se indiretamente o seu conteúdo microbiano através da velocidade de descoloração de soluções de determinados corantes pela ação enzimica dos microrganismos presentes.

Como finalidades básicas do presente trabalho destacam-se:

- A influência da espécie de microrganismo na aplicabilidade do teste de redutase para medir a qualidade microbiológica do leite, quando se empregam os corantes azul de metileno e rezasurina.

- Influência da temperatura da amostra no momento da realização do teste de redutase quando se tem diferentes espécies de microrganismos presentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microorganismos mesofílicos

As bactérias conhecidas como mesofílicas, são microrganismos que se multiplicam numa faixa de temperatura entre 20-40°C, sendo que algumas espécies podem se desenvolver à temperaturas inferiores à 10°C (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

2.1.1. Coliformes

São bactérias normalmente utilizadas como indicadores da qualidade sanitária dos alimentos porque estão em maior número no trato intestinal em relação à outros microrganismos e crescem bem em vários substratos, tornando-se fácil o seu desenvolvimento (FRAZIER, 1967). Essas bactérias também estão altamente relacionadas com os patogênicos intestinais presentes nos alimentos. Assim, a presença de bactérias desse grupo, indicará as condições do tratamento térmico.

co feito, falta de sanificação dos equipamentos e manuseio inadequado (ASHTON, 1950).

Os principais microrganismos coliformes são: *Escherichia coli* e *Aerobacter aerogenes* as quais pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Ambas são bastonetes curtos, gram - negativo e fermentam a lactose com produção de gás, sendo diferenciadas por testes bioquímicos (JAWETZ et alii, 1970).

Além da *Escherichia coli*, proveniente do trato intestinal, temos também representantes dos gêneros: *Klebsiella*, *Salmonella* e *Shigella*, que demonstraram ser patogênicos quando alcançam os tecidos fora do trato intestinal, como, trato urinário, trato biliar, peritônio ou as meninges, causando infecções (JAWETZ et alii, 1970).

Embora, possam se desenvolver a temperaturas entre 4°C e 10°C, quando incubadas à 22°C e 30°C essas bactérias tem o seu desenvolvimento favorecido no leite, mas à 37°C apresentam um crescimento ligeiramente retardado (ASHTON, 1950).

2.1.1.1. *Escherichia coli*

Apresentam-se na forma de bastonete retos, medindo 1,1 a 1,5 por 2,0 a 6,0 µm. Móveis por meio de flagelos peritríquios ou imóveis. São gram-negativo, crescem facilmente em meio de cultura simples (PELCZAR et alii, 1981).

Tem como temperatura ótima 32°C, fermentam a lactose com formação de ácido e gás. Na ausência de hidrato de carbono fermentável são ligeiramente proteolíticos, produ-

zindo indol, 35% de ácido lático e outros compostos como etanol, ácido acético, ácido succínico, anidrido carbônico e hidrogênio (FOSTER et alii, 1957).

Dois são os tipos de *Escherichia coli* enteropatogênicas que podem causar desarranjos de origem alimentar: invasivos e enterotoxinogênicos (FRANK, 1978). As poucas informações sobre a incidência de doenças produzidas por esse microrganismo enteropatogênico, está na dificuldade em diagnosticá-la (SACK, 1975), e se detectar sua presença nos alimentos, por problemas no seu isolamento (MEHLMAN, 1974), bem como a verificação da patogenicidade dos isolados (MEHLMAN, 1976).

Quando ingerida juntamente com os alimentos a *Escherichia coli* causa infecções intestinais (MEHLMAN et alii 1976; MARTER, 1973) e está mais frequentemente associada com diarreias infantis (RYDER, 1976).

São fontes de contaminação desse microrganismo, o esterco, utensílios, solo, metabólitos do trato intestinal humano e de animais vertebrados. Sendo facilmente destruída no processo de pasteurização, a *Escherichia coli* é considerada indicadora da qualidade sanitária na indústria leiteira, podendo provocar alterações de sabor e aroma no leite e derivados (FOSTER et alii, 1957).

2.1.2. Estafilococos

Pertencentes a família *Micrococaceae* aparecem

sob a forma de células esféricas medindo 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, ocorrem isoladamente ou aos pares, com divisão característica em mais de um plano. Tem metabolismo respiratório e fermentativo, anaeróbios facultativos, crescem melhor em condições de aerobiose. A temperatura ótima para seu desenvolvimento está entre 35°-40°C. Principalmente associados com a pele, glândulas cutâneas e mucosas de animais de sangue quente (PELCZAR et alii, 1981).

Produzem enterotoxinas dos tipos: A, B, C, D; E e F (BERGDOLL, 1979), as quais, quando ingeridas juntamente com alimentos provocam intoxicações com os seguintes sintomas: náuseas, vômitos, diarréias e cólicas abdominais, desidratação, prostração e excessiva transpiração; sem ocorrência de febre, essas perturbações não duram mais que dois dias (BRYAN, 1973).

A temperatura ótima para crescimento situa-se entre 35°-39°C, tendo como mínima 7°C e máxima 48°C, em um pH de 9,5-9,8, a produção de enterotoxina ocorre a 10° e 48°C em pH normalmente de 5,3-6,8 (TROLLER, 1976).

2.1.2.1. *Staphylococcus aureus*

As principais fontes de contaminação desse microrganismo são: descargas nasais e da garganta, mãos, pele, cortes infeccionados, fezes, etc.; chegando aos alimentos por falta de cuidados higiênicos no manuseio (BRYAN, 1973).

Essa bactéria é a que mais tem sido constata-

da em casos de intoxicações alimentares, causadas por leite e derivados. Outros veículos desses microrganismos, são também carnes preparadas (FRAZIER, 1967).

O tipo mais frequente de intoxicação alimentar é causado pelas enterotoxinas termoestáveis, produzida quando esse microrganismo cresce em alimentos rico em carboidratos (JAWETZ et alii, 1970). A faixa de temperatura para produção da toxina é de 15,6-46,1°C, sendo a maior produção encontrada entre 21,1-36,1°C. Sob condições ótimas, essa toxina demora de quatro a seis horas para tornar-se detectável (FRAZIER, 1967).

Embora a intoxicação causada por esse microrganismo se caracterize por baixa mortalidade, a frequência dos casos e a severidade dos sintomas, fazem desse tipo de intoxicação, uma importante doença oriunda de vários tipos de alimentos (TROLLER, 1976).

Staphylococcus aureus raramente atinge altas contagens quando presente no leite cru, mas prosperam e produzem enterotoxina no leite pasteurizado (DONNELLY, 1968). Esse microrganismo desenvolve-se bem em meios de cultura sintéticos em condições aeróbicas e anaeróbicas, produzindo toxina anaerobicamente. Nos alimentos, o crescimento e formação de toxina podem ocorrer sob condições anaeróbicas, mas se processam melhor na presença de oxigênio. As contagens de *Staphylococcus aureus* devem ser de 10^7 - 10^8 células/g de alimento para que se produza a quantidade de enterotoxina detectável pelos atuais métodos de análise (TROLLER, 1976).

Segundo TAKAHASKI (1959) o soro oriundo da fabricação de queijo apresenta baixa população de *Staphylococcus aureus*, sugerindo que a maioria fica retida no coágulo.

2.1.3. Streptococos

Aparecem como células esféricas ou ovais com aproximadamente 2 μ m de diâmetro, dispõem-se aos pares ou em cadeias. Não tem motilidade, não formam endosporos, são gram-positivo, e apresentam metabolismo fermentativo para ácidos lático, acético e fórmico. Suas necessidades nutricionais são complexas e variadas. Anaeróbicos facultativos, tem seu ótimo de desenvolvimento à 37°C (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

2.1.3.1. *Streptococcus agalactiae*

São microrganismos associados com leite e tecidos do úbere de vacas que apresentam mastite, bem como com várias infecções humanas. Quando desenvolvem em meio contendo glicose o pH final atinge 4,2 e 4,8. Produzem ácidos a partir de glucose, maltose, sacarose e fermentam o glicerol anaerobicamente. A lactose é fermentada por strains oriundos de isolados de outros animais e humanos. A temperatura ótima para seu desenvolvimento é 37°C (BUCHANAN e GIBBONS, 1974); porém, são destruídos na pasteurização (FOSTER et alii, 1957). Apresentam necessidades nutricionais complexas quanto a vitaminas e aminoácidos (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

2.1.3.2. *Streptococcus faecalis*

Apresentam-se na forma de colônias lisas, raramente pigmentadas, formam cadeias, fermentam a glicose primeiramente em ácido lático. Em meio de cultura contendo glicose o pH final está entre 4,1-4,6 (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

A faixa de temperatura para seu desenvolvimento está entre 10°C e 45°C. São vias de contaminação as fezes humanas e de animais vertebrados, aparecendo ocasionalmente no trato urinário, leite cru e pasteurizado (FOSTER et alii, 1957).

2.1.3.3. *Streptococcus lactis*

Segundo FOSTER et alii (1957) quem primeiramente o descreveu foi Lister.

Formadores de ácido a partir da glicose, maltose, lactose. PH final em meio de cultura contendo glicose está entre 4,0-4,5. Alguns strains produzem antibiótico, inibindo muitos microrganismos gram-positivo. Desenvolvem-se em meio de cultura contendo até 4% de NaCl. Tem crescimento inicial em pH 9,2 e não são capazes de desenvolver em leite contendo 0,3% de azul de metileno. Sua temperatura ótima é de 30°C, sendo que alguns strains crescem à 41°C, mas não à 45°C (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

Contaminante comum do leite e derivados, são microrganismos essenciais para a fabricação de queijos e leites fermentados, sendo também considerados auxiliares na preservação de certos produtos lácteos.

Quando fermentam a lactose contribuem com 0,8 à 1,0% de ácido lático e quantidades traços de ácido acético e propiônico, sendo que a produção diminui com a aeração (FOS TER et alii, 1957).

2.2. Microrganismos psicotróficos

O termo psicotrófico é utilizado na 13ª edição do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (1972), para indicar os microrganismos que são capazes de formar colônias visíveis em meio nutriente agar quando incubados à 7°C por dez dias.

Há mais ou menos uma década atrás, psicotrófico no leite eram chamados de psicrófilos e afirmava-se serem destruídos, em uma pasteurização (ROGICK, 1972; ANDREWS, 1953; WITTER, 1961).

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

Na indústria de laticínios onde grandes volumes de leite ficam armazenados à temperaturas de refrigeração por longos períodos, as bactérias psicotróficas podem desenvolver causando mudanças indesejáveis no leite e nos seus derivados. A presença desses microrganismos indica a baixa qualidade do leite e insatisfatórias condições sanitárias no processamento (ANDREY, 1959; MOSE, 1968).

Podem causar sérios danos em leite e derivados quando estocados a temperaturas que vão de 10-7°C (ELLIKER 1964; FORD, 1969; LUCK, 1972; THOMAS, 1966).

O termo psicrófilo é empregado para designar os microrganismos que tem temperatura ótima de crescimento 15°C ou menos, sendo a máxima 20°C e a mínima 0°C (THOMAS 1969).

Segundo THOMAS (1969), de acordo com as normas da International Dairy Federation, psicrófilos de leite e derivados são definidos como microrganismos que se multiplicam a 7°C ou menos independentemente da temperatura ótima de crescimento.

Os psicrotróficos presentes no leite cru comercial são aqueles pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* (BABEL, 1953).

Segundo THOMAS et alii (1961) comparando-se a contagem de colônias desses microrganismos incubados à 30-50°C, por dez dias e 70 ± 0,5°C nesse mesmo período de tempo, de uma série de cento e dezessete amostras de leite esterilizado, verificou-se um maior número de colônias nas amostras incubadas à 7°C. Desta forma a A.P.H.A. (1972) recomenda para contagem de psicrotróficos as condições acima mencionadas. Por outro lado, OLIVEIRA e PARMELE (1976), verificaram que esses microrganismos no leite desenvolvem-se à temperatura de 21°C, enquanto as mesofílicas crescem lentamente, assim a incubação à 21°C por vinte e cinco horas é equivalente ao tratamento de 7°C por dez dias.

Tem sido verificado, que um reduzido número desses microrganismos sobrevive à pasteurização e esterilização (GROSSKOPF, 1969; WATROUS, 1971; PATEL, 1972; WITTER 1961). Segundo esses mesmos autores, o leite pasteurizado deve ser estocado à 7°C por uma semana, antes dos psicrotróficos resistentes ao calor poderem ser detectados (tempo necessário para o reparo das células danificadas)...

JUFFS e BABEL (1975) utilizando culturas lácteas para inibir as bactérias psicrotróficas, verificaram ser o *Leuconostoc cremoris* a mais efetiva.

De acordo com OVERCAST (1974) o crescimento de bactérias gram-negativa no leite antes do processamento, estimula o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos formadores de esporos.

Segundo MARTH e FRAZIER (1957) o número desses microrganismos no leite é utilizado para se avaliar a qualidade do produto, entretanto (BABEL, 1953) relata que, quando o leite é mantido à 4,4°C, a acidez só se eleva significativamente quando uma elevada população de psicrotróficos está presente.

Considerando a habilidade respiratória desses microrganismos, segundo MORITA (1975) esta diminui durante o tratamento inicial pelo calor nas temperaturas próximas ou ligeiramente acima da máxima de crescimento.

De acordo com ZACHARIAH e LISTON (1973) a adaptação à temperatura, apresenta-se como um fenômeno entre es-

sas bactérias, sugerindo que ocorrem trocas bioquímicas nas células, transferindo-se a capacidade de desenvolverem a baixas temperaturas, bem como a de metabolizar substratos.

2.2.1. Pseudomonas

Dentre os psicrotróficos, uma das famílias de bactérias mais importantes é a *Pseudomonadaceae* contando com aproximadamente cento e quarenta e nove espécies.

As bactérias dessa família são bastonetes, gram negativo, móveis, não esporulados (FRAZIER, 1967). Apresentam metabolismo respiratório, nunca fermentativo, tendo o oxigênio molecular como receptor de elétrons, sendo que algumas espécies utilizam nitratos como aceptores alternativos; são aeróbios estritos (PELCZAR et alii, 1981). Podem se desenvolver entre 0°-37°C, dependendo da espécie considerada, embora a temperatura ótima para o crescimento seja 21°C.

São importantes na deterioração de alimentos como: carnes, ovos, produtos do mar e leite, quando conservados sob refrigeração. As espécies de importância na microbiologia do leite são: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas nigrefaciens*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas viscosa* (FOSTER et alii, 1957).

2.2.1.1. *Pseudomonas fluorescens*

São microrganismos que decompõem vários tipos

de substratos, apresentam pronunciada atividade bioquímica em especial com as proteínas e pouca atividade fermentativa em relação aos hidratos de carbono, sendo as mudanças por elas produzidas do tipo oxidativas (FOSTER et alii, 1957).

Colorem o meio de cultura em um tom verde-pardo (FOSTER et alii, 1957). Segundo LEISINGER e MARGRAFF (1979) trata-se de um pigmento fluorescente denominado pyoverdine, sendo sua emissão máxima à 500nm. O pigmento fluorescente da *Pseudomonas fluorescens* consiste de serina, glicina, ácido glutâmico, ornitina e lisina, sendo este o resultado do metabolismo da própria bactéria.

Segundo MORITA (1975) a *Pseudomonas fluorescens* tem como temperatura ótima de crescimento 15°C e máxima 25°C. Entretanto, a melhor produção de células já descrita na literatura foi de 9×10^8 à 20°C por setenta e duas horas.

Em leite e derivados mantidos sob temperatura de refrigeração, podem conferir sabor amargo aos produtos. São fonte de contaminação dessa espécie; o solo, água, utensílios e equipamentos (FOSTER et alii, 1957).

2.3. Teste de redutase

Segundo BARKWORTH, IRWIN e MATTICK (1941), até 1937 o leite na Inglaterra era classificado por meio de contagem em placas, embora os bacteriologistas já estivessem cien-

tes dos erros e desvantagens desse método, que de certa forma impedia a caracterização do leite em uma faixa mais ampla. Dada as dificuldades da contagem por semeadura, o teste de redução de corantes foi introduzido na rotina industrial, passando a ser usado em larga escala.

Em janeiro de 1937 o Ministério da Saúde da Inglaterra abandonou o uso da técnica de contagem em placas, substituindo-a pelo teste de redutase, considerando a descoloração total no leite à temperatura estipulada. Por outro lado, o efeito da temperatura sobre o crescimento bacteriano é notório, evidenciando muito pouco quando comparada à contagem em placas.

Para DEMETER (1969), a redução dos corantes constitui uma prova específica do estado de frescor do leite cru e sua capacidade de conservação frente à acidificação, sendo uma forma de se determinar o conteúdo geral de germes. Oferecem também uma maior concordância dos microrganismos em leite comercial, onde há uma coincidência com o grau de acidez. Assim em 90% dos casos o tempo de redução ocorre onde há flora contendo bactérias mesófilas produtoras de ácido lático.

Esse mesmo autor considera que as provas se apresentam mais imprecisas quanto maiores forem as oscilações na flora devido à influência de fatores como: leite pobre em germes vindo de somente um estábulo ou de um animal, leite pasteurizado, taxa de leucócitos, estações do ano, ordem de ordenha (manhã ou tarde), resfriamento prolongado no qual

há o desenvolvimento de psicrófilos (baixa atividade de redução), higiene empregada na manipulação do leite, etc.

A diferença nos métodos bacteriológicos de determinação de microrganismos está baseada nas condições climáticas e composição da flora microbiana, não se podendo estabelecer uma caracterização satisfatória do leite tomando como base somente a prova de redução, visto que, a amplitude de variações no número de microrganismos é muito grande para o mesmo tempo de redução.

Segundo SOLBERG et alii (1974) o teste baseia-se no fato da maioria das bactérias que se desenvolvem no leite, abaixarem o potencial de oxidação-redução, provocando mudança da cor de certos corantes, estimando indiretamente o número de bactérias nas amostras de leite, as quais determinam mudanças no substrato causadas pela atividade metabólica, diminuindo a quantidade de oxigênio dissolvido e pela produção de metabólitos e enzimas específicas.

De acordo com Standard Methods for the Examination Dairy Products (A.P.H.A., 1978) o tempo de redução deve ser inversamente proporcional à população bacteriana, o que foi comprovado comparando-se a variação do tempo de redução com as populações bacterianas determinadas por outros métodos. Por outro lado, leites contendo números equivalentes de bactérias podem ser reduzidas a diferentes tempos, dependendo da fase de crescimento predominante da bactéria.

A aplicação do teste permite classificar as

amostras em dois ou mais grupos, de acordo com as diferenças das espécies bacterianas, mas para colostro, leite evaporado e leite de animais em adiantado estágio de lactação, o tempo de redução não é proporcional à população bacteriana. Entretanto, o teste permite um melhor controle rotineiro de trabalho.

Espécies bacterianas, como por exemplo, o *Streptococcus lactis*, reduz rapidamente o corante, sendo utilizado para detectar leites de qualidade inferior (HAMER, 1948), enquanto as proteolíticas tem pequeno poder de redução (SCHNERR 1959).

Segundo o Standard Methods for the Examination Dairy Products (A.P.H.A., 1978), o teste pode ser influenciado por fatores como:

- diferença na atividade de redução de espécies bacterianas quando a amostra é incubada a $36 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Por exemplo, a maioria das bactérias termoturicas são menos ativamente redutoras do que muitas de outras contaminantes comuns do leite que são prontamente detectadas no teste de redutase. O mesmo ocorrendo com as bactérias psicotróficas.
- variação na proporção de bactérias que se deslocam na camada de creme pela elevação dos glóbulos de gordura.
- presença de substâncias inibidoras, como resíduos de antibióticos, do tratamento da mastite bovina.

2.3.1. Redução do corante

Segundo FOSTER et alii (1957), os métodos de redução de corantes baseiam-se na capacidade que certos microrganismos tem de alterar o potencial de oxidação - redução do meio. Ele é fundamentalmente uma medida na tendência de um sistema reversível de liberar e captar elétrons, sendo a oxidação um processo que se comporta como perda de elétrons e a redução admissão de elétrons.

Em sistemas biológicos tais como cultivo de microrganismos, as reduções e oxidações simultâneas são fonte de energia para os processos celulares.

As oxidações biológicas são mais entendíveis considerando que há uma perda de hidrogênio ou ganho de oxigênio, cada uma das quais equivalendo a uma perda de elétrons.

Compostos como glutathione, cisteína, ácido ascórbico, azul de metileno e rezasurina podem servir de aceptores de hidrogênio para muitas bactérias que necessitam dos sistemas de enzimas, tal como o citocromo, para utilizar o oxigênio como receptor de hidrogênio. Esses compostos podem também ser utilizados por microrganismos, nos quais o oxigênio é ordinariamente o receptor final, quando esses se encontram sem oxigênio livre.

Geralmente, os meios de cultivo são redutores, isto é, tem baixo potencial de oxi-redução quando em ausência de oxigênio e potencial elevado quando está em equilíbrio com esse elemento.

De acordo com esses mesmos autores, a redução do azul de metileno e da rezasurina nas provas de redutase depende da capacidade dos microrganismos presentes nos produtos lácteos, para produzir condições redutoras no meio em que estão proliferando.

Por outro lado, a inversão dos tubos exatamente no momento da redução atrasa frequentemente a mudança da cor, pela introdução de oxigênio, elevando o potencial de oxirredução.

2.3.2. Redução do azul de metileno

O princípio da redução do azul de metileno foi desenvolvido por Barthel e Orla-Jensen em 1912 (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1974).

Esse corante é encontrado no comércio como cloreto de sódio mais cloreto de zinco, representado pela fórmula: $2C_{16}H_{18}N_3SCl + ZnCl_2 + H_2O$ recebendo a designação de 3,9-Bisdismethylamino-phenazothionium chloride, apresentando a seguinte estrutura química.

Na forma reduzida:

(MERCK INDEX, 1960)

LEUCO AZUL DE METILENO

Segundo FOSTER et alii (1957) diferentes explicações tem sido oferecidas para o mecanismo de redução do azul de metileno durante o teste. Como o oxigênio é removido do leite através do processo respiratório das bactérias ocorre a mudança no potencial de oxi-redução. Tendo o oxigênio normalmente potencial positivo, quando esse diminui possivelmente o hidrogênio presente nos constituintes do leite e metabólitos das bactérias são transferidos para o azul de metileno fazendo-o passar para a forma leuco (incolor).

De acordo com o Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1978) a leitura dos resultados poderá ser feita após trinta minutos de incubação dos tubos a $37^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, de hora em hora ou até a descoloração total.

Este mesmo compêndio faz a seguinte observação; "embora a redução do azul de metileno ocorra em baixos va

lores de pH (>acidez) a habilidade de um microrganismo em produzir ácido e reduzir o corante não são necessariamente correlacionados".

2.3.3. Redução da rezasurina

Rezasurina, corante vermelho escuro, recebe a denominação de Diazo-resorcinol-3-isofenoxazinone 10-oxide, com a seguinte estrutura química.

(MERCK INDEX, 1960).

O uso da rezasurina é uma prova similar à do azul de metileno, para se medir a qualidade bacteriológica do leite, utilizando-a como indicador. Sua cor em pH normal é azul. Este composto se reduz a resorufina, de coloração rosada, mudando lentamente durante o processo de redução, passando da cor inicial, para tonalidades de lilás até rosa. Este estágio da reação é irreversível e a mudança para resorufina produz um abaixamento no potencial de oxi-redução.

Seguindo-se, este composto se reduz a hidrorresorufina, que é incolor, sendo esta última reação reversível (FOSTER et alii, 1957).

De acordo com o Standard Methods for the Exa-

mination of Dairy Products (A.P.H.A., 1978), o registro de leitura dos resultados pode ser de dois tipos:

1. Teste de Leitura Tríplici~~e~~ - estabelecendo - se uma cor padrão: lilás; comparando-a com a dos tubos ao final de três sucessivos intervalos de uma hora de incubação.

2. Teste de Leitura de Uma Hora - utiliza - se uma sequência de cores, partindo-se do azul, para tonalidades intermediárias de lilás até rosa; a qualidade para classificação do leite, depende da cor presente ao final do tempo estipulado para o teste.

2.4. Emprego do teste de redutase

NADER FILHO, SCHOCKEN-ITURRINO, FUKUDA (1983) realizaram um estudo comparativo entre a prova da redutase, contagem em placas e contagem leucocitária em amostras de leite "in natura", oriundas de vacas positivas ao California Mastitis Test (CMT). Verificaram ~~h~~aver uma provável interferência dos leucócitos quando presentes no leite em número elevado, de modo a abreviar o tempo de redução do azul de metileno. Entretanto, esse fato não invalida a utilidade do teste de redutase na rotina do Serviço de Inspeção, uma vez que as variações observadas ocorreram no sentido de colocar fora dos padrões regulamentares, um produto considerado impróprio para o consumo.

Esses mesmos autores, estudando o teste de redutase para animais negativos ao California Mastitis Test (CMT) utilizaram vários agentes etiológicos da mastite bovina, inoculados experimentalmente em amostras de leite com pequeno número de leucócitos (>100.000 leucócitos/ml). Os resultados obtidos demonstraram que a interferência de leucócitos foi considerada mínima para se colocar o produto fora dos padrões regulamentares permitida pelo Ministério da Agricultura, quando esses estão em pequeno número e confirmaram a eficiência do teste de redutase, aliados à rapidez, facilidade de execução e baixo custo, justificando assim sua ampla utilização a nível de estabelecimentos industriais.

Para LOPES, SILVA FILHO e PORTO (1964) a prova de redutase pode apresentar limitações quanto a capacidade redutora de diferentes microrganismos, visto que, certos strains de *Streptococcus* causadores de mastite bovina não reduzem o azul de metileno, o qual exerce uma ação inibidora sobre os mesmos. Assim sendo, se estas bactérias estiverem presentes no leite em elevado número poderá haver uma diminuição da eficácia do teste. Por outro lado, NADER et alii (1983), estudando a atividade de agentes etiológicos da mastite na redução do azul de metileno, concluíram que a maioria dos estreptococos tem comportamento semelhante no decorrer da prova, refutando a afirmação de LOPES et alii (1964), com relação a não redução do referido corante por strains de *Streptococcus* causadores da mastite bovina.

NICHOLS e EDWARDS (1936), também já haviam demonstrado que a presença de *Streptococcus mastitis* em leites homogenizados não afeta o tempo de redução.

BERMÚDEZ, BONILLA, DEL-BAGLIVI e LABORDE (1976) preocupados com o fator higiene do leite, utilizaram entre outros métodos, o de redução do azul de metileno (TRAM). Os resultados foram positivamente confirmados, obtendo-se para o teste, os seguintes valores: 2,06% das amostras tiveram um tempo de redução superior a cinco horas e 47,88% tempo menor que meia hora, demonstrando assim a má qualidade higiênica, fato esse atribuído a falta de conhecimentos, não utilização do resfriamento e transporte inadequado.

Para FRANKLIN (1965) o tipo e quantidade de microorganismos contidos no leite são fatores primordiais na sua qualidade o que depende do grau de higiene praticado na ordenha. Sendo que o equipamento utilizado pode constituir-se em uma das mais importantes fontes de contaminação (SMYTH, 1960).

Baseados em afirmações como estas, PEDRAZA, ROMERO e GREAVES (1978) estudaram o grau de contaminação bacteriana no leite após sua passagem pelo equipamento de ordenha mecânica, o efeito do resfriamento, o efeito do período de armazenagem; utilizando-se a determinação de acidez, pH, tempo de redução do azul de metileno (TRAM) e contagem em placas. Concluíram que o método de redução do azul de metileno é de grande valor para se medir a qualidade bacteriológica do leite cru e que há uma alta correlação entre o teste de redução do corante e contagem bacteriana.

OTSUKA e NAKAE (1969) utilizaram um novo método de redução, empregando a rezasurina em papel de filtro, com o propósito de se determinar a qualidade sanitária no leite cru em comparação com a contagem em placas. Os resultados experimentais demonstraram uma alta correlação entre contagem em placas e o teste da rezasurina com papel de filtro, tornando possível medir-se a constante da velocidade na reação, mudança na descoloração da forma rezasurina para resorufina no papel de filtro, indicando ser uma reação unimolecular. Os autores concluíram que esse método é bastante vantajoso dada a precisão e simplicidade que são maiores do que a forma convencional em tubos.

DÁBBAH, MOATS, TATINI e OLSON (1969), selecionaram amostras de leite vindas de produtores distantes para a industrialização, analisando-as pelo método de contagem em placas a 32°C, teste de redução da rezasurina de uma hora (RRTlh) até a descoloração total. Concluíram que a aplicação do teste da RRTlh combinada a uma sequência de cores, demonstrou ser a melhor, enquanto que, os outros métodos apresentam como único inconveniente o tempo, que é maior. Por outro lado, deve ser ressaltado que, no teste de RRTlh, para pessoas que não distingam cores intensas, torna-se difícil a identificação da sequência de cores.

THAKRE e NAMBU DRIPAD (1962) demonstraram que a taxa de atividade microbiológica e a marcha de deterioração no leite pasteurizado é mais rápida a 30°C do que a 37°C, assim

(SUDARSANAM et alii, 1978), correlacionaram o tempo de redução no leite armazenado utilizando o azul de metileno, rezasurina e nitrato, concluindo que o teste de redução à 30°C não é adequado para se medir o grau satisfatório no leite pasteurizado armazenado e que esses testes realizados segundo os padrões atuais (37°C) são bastante eficientes na avaliação da qualidade do leite sob as mesmas condições, tenha ele grau satisfatório inicial ou não.

BARKWORTH, IRWIN e MATTICK (1942), utilizando os principais testes como contagem em placas, teste de redução do azul de metileno à 37°C, redução do corante à 15,5°C, nas diferentes estações do ano; comparou-os para com isso somar informações referentes aos métodos, concluíram que o tempo de redução é afetado pelo número de bactérias e sua atividade metabólica no período que compreende entre o tempo de retirada do leite e o da realização do teste, sendo necessária uma população inicial elevada para que se obtenha um abaixamento no potencial de oxi-redução que atenda as condições padronizadas.

WILSON (1936) demonstrou que o tempo de redução em leites que apresentem uma contagem microbiana superior à 200.000/ml demoram para descolorir o corante um total de cinco horas no verão e seis horas no inverno. Enquanto um leite com alto conteúdo bacteriano e pouca gordura, na estação do inverno, reduz o azul de metileno em cinco horas.

BARKWORTH et alii (1942) examinaram o efeito

da temperatura sobre o tempo de redução das amostras, relacionando principalmente ao efeito de temperaturas ambiente. JOHNS (1930) utilizando-se da técnica com azul de metileno demonstrou que a incubação prévia das amostras por dezoito horas à 12,8°C oferece uma melhor relação com a qualidade de conservação. Segundo HOY e BRAZ (1938) a temperatura de armazenagem afeta grandemente o tempo de redução sobre a habilidade do teste, rejeitando-se leites com altas contagens em placas e que o armazenamento por dezoito horas à 21,1°C foi muito rigoroso, enquanto que o tempo de exposição menos severo de doze horas à 18,3°C ou dezoito horas à 15,6°C teve praticamente o mesmo efeito. É geralmente tido que a exposição a altas temperaturas faz com que amostras de leite originalmente boas, tenha um tempo de redução menor, bem como nas estações frias do ano, o teste de redução pode igualmente subestimar a população bacteriana.

De acordo com CHALMERS (1938), estudando a correlação existente entre a diferença na taxa de crescimento para as distintas espécies que se desenvolvem durante o teste de redução à 37°C e a 15°C, visando a melhoria na qualidade do leite, mantendo-o por um período de duas horas à temperatura de 15°C para posteriormente submetê-lo ao teste à 37°C, comparando-o com leite da ordenha matinal mantido por uma, sete, dezesseis e vinte e três horas nas mesmas condições. Concluiu que a incubação prévia por um período de quinze à vinte

e quatro horas à 15°C apresenta uma melhor correlação quando comparada no teste à 37°C; do que o leite que é examinado logo após sua produção, não sendo considerado seguro para comercialização.

HISCOX (1932) trabalhando com leite já processado e resfriado, adicionou o corante azul de metileno à amostra de leite mantendo-a à 15°C, período designado como pré-via incubação, submetendo-a posteriormente ao teste, considerando-se como ponto final a forma leuco (descoloração total), verificou que não há variação no decorrer do processo independente do leite ter sido fervido ou resfriado.

Segundo BARKWORTH et alii (1942), o conteúdo de coliformes em leite é de grande importância quando se visa qualidade, além do que a presença desses afeta o tempo de redução. Assim, para um produto mantido à 15,6°C e testado pelo azul de metileno à 35°C, afetará os tipos de microrganismos coliformes que irão proliferar, os resultados porém indicam que o efeito não é marcante, visto que a simples presença desse grupo já diminui o tempo de redução.

Sabendo-se que a contagem em placas estima o número de bactérias independentemente de sua ação no leite, o tempo de redução é influenciado pelos tipos e números de microrganismos presentes antes da realização do teste (BARKWORTH et alii, 1942).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Matéria prima

O leite utilizado foi obtido do rebanho do Departamento de Zootecnia da E.S.A. "Luiz de Queiroz", sendo sempre coletado na primeira ordenha. Após a coleta, o leite era imediatamente levado para o laboratório para ser preparado.

3.1.2. Microrganismos

Os seguintes microrganismos foram utilizados para inoculação da matéria prima.

Relação de microrganismos utilizados na inoculação da matéria prima.

INSTITUIÇÃO	MICROORGANISMO	PROCEDÊNCIA	MEIO DE CULTIVO
INSTITUTO ZIMOTÉCNICO (ESALQ)	<i>Escherichia coli</i>	IZ 923	Caldo nutriente e 3% de YE.
INSTITUTO ZIMOTÉCNICO (ESALQ)	<i>Staphylococcus aureus</i>	IZ 1974	Caldo nutriente 7,5% de NaCl 3% de YE.
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ITAL)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	Caldo nutriente e 3% de YE
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ITAL)	<i>Streptococcus lactis</i>	-	Caldo F (McKAY and BALDWIN, 1973)
INSTITUTO "ADOLFO LUTZ"	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	Brain Heart Infusion (DIFCO)
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ITAL)	<i>Streptococcus faecalis</i>	-	Brain Heart Infusion (DIFCO)

3.1.3. Corantes

Foram utilizadas soluções de azul de metileno a 0,0044% em pH 6,22 e rezasurina a 0,005% em pH 6,99; segundo indicações feitas pelo Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1978).

3.1.4. Soluções da Escala de McFarland

São utilizados sete tubos de cultura contendo soluções de BaCl_2 e H_2SO_4 nas proporções indicadas no método, página 33.

3.1.5. Água peptonada

Para o seu preparo 0,1 g de Bacto Peptona (DIFCO) foram dissolvidas em 100 ml de água destilada, distribuídas em tubos de cultura, esterilizados em autoclave a 120°C por quinze minutos.

3.2. Métodos

3.2.1. Escala de McFarland

O número de células em uma suspensão bacteriana pode ser determinado por turbidimetria, com a vantagem de se poder medir diretamente o número de células. Na escala de McFarland são utilizados sete tubos preparados contendo soluções de BaCl_2 e H_2SO_4 , fechados com rolhas e que podem ser utilizados durante anos na comparação de suspensões bacterianas medindo-se a transmitância de luz, concluindo diretamente a densidade da suspensão (KIRALY et alii, 1974).

TUBO	BaCl_2 ml %	H_2SO_4 ml %	Nº BACTÉRIAS/ml	T %	A
1	0,01	9,99	$30.000.000=3 \times 10^7$	97,5	0,01
2	0,05	9,95	$150.000.000=1,5 \times 10^8$	85,1	0,07
3	0,1	9,9	$300.000.000=3 \times 10^8$	76,1	0,12
4	0,15	9,85	$450.000.000=4,5 \times 10^8$	67,0	0,174
5	0,2	9,8	$600.000.000=6 \times 10^8$	54,0	0,279
6	0,3	9,7	$900.000.000=9 \times 10^8$	44,2	0,351
7	0,4	9,6	$1.200.000.000=1,2 \times 10^9$	31,5	0,50

Preparou-se a escala sendo a absorbância e transmitância das soluções medidas em espectrofotômetro modelo G/20 Junior II COLEMAN, a 420 nm de comprimento de onda (OLSEN e JEZESKI, 1963).

Tomou-se como padrão de inóculo o tubo número quatro da Escala de McFarland que representa 4.5×10^8 bactérias/ml, considerando-se esta população como satisfatória para o teste de redutase, uma vez que o tempo mínimo de redução estabelecido pela DIVISÃO DE INSPEÇÃO DE LEITE E DERIVADOS (DILEI) do Ministério da Agricultura (1980) deve ser de duas horas e trinta minutos, correspondendo a uma população aproximadamente de 5×10^5 a 4×10^6 bactérias/ml.

3.2.2. Preparo do inóculo

As culturas de microrganismos foram inoculadas assepticamente em meios de cultura segundo suas necessidades nutricionais e incubadas em estufa Retilínea FANEM modelo 315/3 nas temperaturas consideradas como sendo ótimas para seu desenvolvimento, sendo para os mesófilos 32° e 35°C por vinte e quatro horas e psicrófilos a 21°C por um período de vinte e cinco horas. Ao final desse tempo, foram submetidas à diminuição na temperatura para aproximadamente 5°C a fim de paralisar o metabolismo. Posteriormente, em centrífuga angular SEVALL tipo SS1, foram centrifugadas por três vezes a 5000 rpm por quinze minutos, sendo a massa celular lavada e ressuspensa em água peptonada esterilizada a 1% a cada centrifugação.

Posteriormente, homogeneizado em agitador VORTEX GENIE modelo K55 G à 1000 rpm e acertadas as concentrações pelo espectrofotômetro, utilizando-se como referência água destilada esterilizada, e fazendo-se as diluições necessárias para obtenção da absorbância e transmitância correspondente à do tubo número quatro da Escala de McFarland.

3.2.3. Preparo da matéria prima

Distribuiu-se 8 ml de leite em tubos de cultura de 15 mm por 160 mm com tampa de rosca, esterilizando-os em vapor fluente à 121°C ou 1 atm por vinte minutos. Após a esterilização os tubos com leite tiveram suas temperaturas ajustadas para 35°, 30°, 25°, 20°, 15°, 10° e 5°C, por estarem na faixa próxima das temperaturas, às quais o leite pode chegar à usina de beneficiamento. Foram preparados três tubos para cada temperatura ensaiada.

3.2.4. Procedimento experimental

Em câmara asséptica, para cada triplicata de tubos com leite nas temperaturas previamente elegidas, adicionou-se 1,0 ml do inóculo do microrganismo a ser testado no

momento e 1,0 ml de um dos corantes (azul de metileno ou rezasurina).

Fechados hermeticamente, os tubos foram homogeneizados com inversão lenta de modo a evitar a incorporação de oxigênio, seguindo-se a incubação em banho-maria modelo LAVEL à $37^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

3.2.5. Planejamento experimental e análises estatísticas

O tempo de redução do azul de metileno e rezasurina foi medido em minutos, até a descoloração total.

As análises estatísticas do tempo de descoloração dos corantes foram realizadas obedecendo ao modelo matemático próprio para o delineamento em blocos ao acaso, testando-se sete temperaturas de inoculação da matéria prima, para seis diferentes culturas bacterianas e dois corantes, perfazendo uma média de dez repetições para cada situação.

As regressões foram avaliadas através do coeficiente de determinação R^2 , e as correlações pelo coeficiente de correlação r , escolhendo-se quando possível o de maior grau de significância, tendo como limite o 2% grau.

Os esquemas de análise de variância adotados foram:

Esquema de análise de variância para delineamento em blocos ao acaso.

Causas da variação	G.L.
Tratamentos	$I - 1$
Blocos	$B - 1$
Resíduo	$(I-1) \times (B-1)$
Total	$(I \times B) - 1$

$I = n^{\circ}$ total de tratamentos

$B = n^{\circ}$ total de blocos

As comparações entre as médias dos tratamentos foram efetuadas pelo teste de Tukey, ao nível de 0,05 e 0,01 de significância.

As análises dos dados foram realizadas através de computador eletrônico IBM-1130 do Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ/USP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Escherichia coli e azul de metileno (Tabelas 1 e 2)

A análise de variância mostra que não houve significância para os tratamentos, indicando que a temperatura inicial da amostra não interferiu na atividade da *E. coli* IZ 923 na redução do azul de metileno. Por outro lado, houve significância a nível de 0,01 entre os blocos, sugerindo que embora se tenha seguido uma homogeneidade nos experimentos, em pelo menos dois deles ocorreram variação. Isto pode ser decorrência do efeito da variação nas características da cultura microbiana, que possa ter ocorrido durante a condução dos experimentos.

A não variação do comportamento desse microrganismo com a temperatura inicial da amostra, foi um fato não esperado, uma vez que, sendo um mesófilo com faixa ótima de atividade entre 25°C-32°C, esperava-se um tempo maior de descoloração para as amostras a temperaturas inferiores, pois es-

Tabela 1. Tempo de redução do corante, azul de metileno, *Escherichia coli* IZ 923 (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	248,3	254,0	253,3	258,3	246,3	250,6	235,3
2	203,3	202,3	202,0	214,3	209,0	203,3	210,0
3	253,4	256,0	260,0	255,0	248,0	268,6	231,0
4	245,0	257,3	263,6	268,0	268,6	270,0	249,0
5	210,6	211,3	222,0	239,8	267,9	227,0	226,4
6	251,3	244,6	237,9	239,4	237,4	231,6	255,0
7	223,3	208,0	224,0	221,6	210,8	218,3	223,6
8	270,6	274,3	283,6	283,0	285,0	283,3	269,0
9	218,6	225,0	228,3	230,0	230,3	233,3	215,3
10	271,6	275,3	279,3	281,0	278,0	279,6	272,0
Média	239,6	240,8	245,4	249,0	248,1	246,6	238,7

Tabela 2. Análise de variância do teste de redutase, *Escherichia coli* IZ 923 e azul de metileno

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamentos	6	1090,22265	181,70377	2,2121
Blocos	9	36726,61332	4080,73481	49,6809**
Resíduo	54	4435,46609	82,13881	
Total	69	42252,33206		

** Significativo ao nível de 0,01

sas teriam um lapso de tempo maior para atingir a temperatura ótima para o desenvolvimento desse microrganismo.

O teste de Tukey (Apêndice - Tabelas 1 e 2) mostrou que não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos, concluindo-se que a temperatura da amostra na inoculação, não influenciou diretamente no tempo de descoloração do azul de metileno pelo microrganismo.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 3,7139%.

Na Tabela 14 (Apêndice) encontram-se os resultados da análise de variância para regressão, para esse microrganismo, onde observa-se significância para o componente do 2º grau ao nível de 0,01.

Colocando-se esses dados num sistema de eixos cartesianos (Gráfico 1) observa-se um aumento no tempo de redução do corante com o aumento da temperatura da amostra na inoculação até 20°C e a partir dessa, os tempos de redução de cresceram com a temperatura da amostra. Isto demonstra um comportamento irregular desse "strain" de *E. coli* IZ 923, como já discutido anteriormente.

Segundo o Standard Methods for the Examination of Dairy Products (A.P.H.A., 1978), leites contendo número equivalente de bactérias podem reduzir o corante a diferentes tempos, dependendo da fase de crescimento predominante da bactéria. Apesar de que no presente caso os experimentos foram realizados após vinte e quatro horas de incubação do mi-

Gráfico 1. Comportamento da *Escherichia coli* IZ 923 e azul de metileno.

crorganismo em meio de cultura adequado ao seu desenvolvimento, partindo-se do princípio de que na suspensão bacteriana utilizada, essas estivessem sempre na mesma fase de desenvolvimento.

BARKWORTH et alii (1942) fazendo uma pré-incubação do leite a 15,6°C, e testando o tempo de redução do azul de metileno à 35°C, verificaram que esta pré-incubação afetava a atividade dos coliformes presentes. Desta maneira, deduz-se que no caso do "strain" de *E. coli* IZ 923 utilizado neste experimento, quando inoculado a temperaturas inferiores de 5°, 10° e 15°C, o tempo requerido para atingir à temperatura do método (37°C), tenha proporcionado uma modificação da característica metabólica do microrganismo embora, o tempo para as amostras atingirem a temperatura do experimento tenha sido relativamente curto: 20, 25 e 28 minutos respectivamente para as temperaturas iniciais de 5°, 10° e 15°C.

4.2. Escherichia coli e rezasurina (Tabelas 3 e 4).

A análise estatística dos resultados mostram que houve significância ao nível de 0,01 para blocos e tratamentos, o que significa que pelo menos entre dois dos experimentos houve variação e as temperaturas iniciais de inoculação influíram no comportamento do microrganismo em relação ao tempo de descoloração da rezasurina.

Tabela 3. Tempo de redução do corante, rezasurina, *Escherichia coli* IZ 923 (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	497,0	500,0	501,0	503,0	505,0	506,0	505,0
2	492,6	494,6	490,2	489,0	499,9	497,0	503,3
3	494,6	499,6	497,3	502,6	505,6	510,0	518,3
4	444,3	441,3	457,0	457,0	462,6	456,3	470,3
5	493,0	498,6	502,6	503,3	505,3	511,3	516,0
6	493,0	492,6	492,3	501,6	505,3	510,0	516,0
7	493,6	499,3	505,0	507,6	514,6	514,0	516,6
8	468,3	486,6	478,9	481,2	489,0	486,6	483,3
9	461,0	464,7	462,3	469,7	472,3	477,1	481,0
10	472,6	475,6	475,0	476,1	476,4	478,1	479,2
Média	481,0	485,3	486,2	489,1	493,6	494,6	498,9

Tabela 4. Análise de variância do teste de redutase, *Escherichia coli* IZ 923 e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamentos	6	2324,79687	387,46614	23,4815**
Blocos	9	20060,65626	2228,96180	135,0814**
Resíduo	54	891,04687	16,50086	
Total	69	23276,50001		

** Significativo ao nível de 0,01

Pelos dados das Tabelas 1 e 3 (Apêndice) constatase que os tratamentos à 35°, 30° e 25°C não agiram com rigor no processo de descoloração da rezasurina pela bactéria, quando comparada as temperaturas inferiores; ressaltando que a 10° e 15°C, praticamente não houve diferença significativa estatisticamente entre as médias.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 0,8293%.

A análise de variância para regressão, Tabela 15 (Apêndice) demonstrou significância para o componente do 1º grau ao nível de 0,01. Assim, pelo Gráfico 2, observa-se uma correlação positiva e linear entre a temperatura da amostra no momento da inoculação e o tempo de redução do corante.

O tempo de descoloração aumentou com a elevação da temperatura inicial da amostra. Este comportamento é completamente não usual para esse microrganismo, o que pode ser decorrência de variações incontrolláveis nas características normais do microrganismo.

4.3. Staphylococcus aureus e azul de metileno

(Tabelas 5 e 6)

Os resultados mostram que houve significância ao nível de 0,01 para blocos e tratamentos, demonstrando que a temperatura de inoculação da amostra influenciou o compor-

Gráfico 2. Comportamento da *Escherichia coli* IZ 923 e reza-surina.

Tabela 5. Tempo de redução do corante, azul de metileno, *Staphylococcus aureus* IZ 1974 (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	132,0	134,6	119,1	118,8	116,4	120,0	118,0
2	138,0	135,6	115,0	116,0	118,0	119,0	116,0
3	140,0	137,6	127,6	129,0	128,3	130,0	127,6
4	136,0	128,6	123,6	125,6	126,0	126,3	128,3
5	138,6	134,6	128,0	126,3	124,6	124,6	123,3
6	134,6	127,6	122,3	123,3	123,3	123,0	125,0
7	133,0	131,0	126,0	126,0	126,6	127,0	126,0
8	130,0	129,0	127,0	128,0	126,0	127,6	126,6
9	130,6	131,0	128,3	129,6	124,3	128,0	125,0
10	130,0	128,0	115,0	115,3	116,6	118,6	123,0
Média	134,3	131,8	123,2	123,8	123,0	124,4	123,9

Tabela 6. Análise de variância do teste de redutase, *Staphylococcus aureus* IZ 1974 e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamentos	6	1297,10644	216,18440	22,7771**
Blocos	9	689,43847	76,60427	8,0710**
Resíduo	54	512,52929	9,49128	
Total	69	2499,07422		

** Significativo ao nível de 0,01

tamento do microrganismo em relação à redução do azul de metileno e que também não houve homogeneidade pelo menos entre dois dos experimentos.

De acordo com os dados da Tabela 4 (Apêndice) e os resultados obtidos do teste de Tukey, Tabela 1 (Apêndice) verificou-se que nas temperaturas de 50 e 100°C é que o tempo de redução do corante foi maior, não sendo observadas variações significativas estatisticamente para os demais tratamentos, enquadrando-se dentro dos padrões da literatura esperado para esse microrganismo em relação à metodologia.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 2,4386%. No Apêndice (Tabela 16) estão inseridos os resultados da análise de variância para regressão, apresentando significância ao nível de 0,01 para tratamentos e componentes do 1º e 2º grau. Observa-se pelo Gráfico 3, uma diminuição do tempo de redução com o aumento da temperatura inicial da amostra até a temperatura de 25°C, e, acima dessa o tempo de redução aumentou, embora com diferenças muito pequenas.

4.4. Staphylococcus aureus e rezasurina (Tabelas 7 e 8)

O teste F (análise de variância) mostra que houve significância ao nível de 0,01 para tratamentos e blocos. Portanto, a temperatura de inoculação da amostra in-

Gráfico 3. Comportamento do *Staphylococcus aureus* IZ 1974 e azul de metileno.

Tabela 7. Tempo de redução do corante, rezasurina, *Staphylococcus aureus* IZ 1974 (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	128,6	128,3	128,3	123,6	125,0	125,0	124,6
2	127,0	124,3	122,3	122,0	121,3	121,3	123,3
3	121,3	114,2	111,3	109,0	110,3	111,6	114,0
4	117,3	117,2	123,0	119,4	112,3	118,6	121,3
5	118,6	121,2	109,6	114,0	113,6	115,3	117,3
6	124,3	123,6	126,0	120,0	120,0	121,2	119,6
7	124,6	124,6	122,3	125,0	124,2	125,3	126,0
8	125,3	125,6	124,6	124,6	123,0	123,6	123,3
9	125,0	122,3	121,3	121,6	121,6	120,0	121,6
10	125,6	125,3	124,3	122,6	123,3	122,0	124,0
Média	123,8	122,6	121,3	120,1	119,5	120,3	121,6

Tabela 8. Análise de variância do teste de redutase, *Staphylococcus aureus* IZ 1974 e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamentos	6	134,31591	22,38598	4,8231**
Blocos	9	1134,56103	126,06233	27,1604**
Resíduo	54	250,63525	4,64139	
Total	69	1519,51220		

** Significativo ao nível de 0,01

fluiu no comportamento do microrganismo em relação ao tempo de redução do corante, tendo ocorrido também variação em pelo menos, dois dos experimentos.

Pelos resultados do teste de Tukey, Tabelas 1 e 5 (Apêndice) verifica-se que a variação entre as médias dos tratamentos não foi significativa, embora, como já discutido anteriormente (Tabela 8) as temperaturas elegidas para as amostras no momento da inoculação afetaram de certa forma o tempo de descoloração da reزارusina por esse microrganismo.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 1,7756%.

Os valores da análise de variância para regressão Tabela 17 (Apêndice) nos permitiram observar a significância para o componente do 2º grau, partindo-se dos quais se construiu o Gráfico 4, onde se verifica que esse microrganismo apresentou uma redução no tempo de descoloração da reزارusina até 25°C, decrescente, aumentando ligeiramente, para as temperaturas acima desta (30°C e 35°C).

4.5. Streptococcus agalactiae e azul de metileno

(Tabelas 9 e 10)

A análise de variância (Teste F), Tabela 10, mostra que houve diferença significativa ao nível de 0,01 de probabilidade para blocos, o que demonstra que há variação en

Gráfico 4. Comportamento do *Staphylococcus aureus* IZ 1974 e rezasurina.

Tabela 9. Tempo de redução do corante, azul de metileno, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (minutos).

Blocos Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	60,0	57,2	50,3	52,3	53,0	50,3	53,6
2	62,3	55,0	62,0	60,0	57,4	53,6	52,4
3	44,6	47,3	49,6	50,6	44,3	45,3	45,6
4	53,3	45,6	49,3	44,3	45,0	45,0	47,3
5	54,6	56,6	56,6	57,1	58,3	53,0	53,0
6	50,3	50,6	49,0	51,6	50,0	50,0	53,3
7	53,6	57,6	60,0	57,6	55,3	52,3	53,8
8	58,6	57,6	59,0	61,0	57,2	48,6	47,0
9	58,9	57,3	58,0	58,3	60,0	61,6	64,0
10	61,3	57,8	57,6	57,0	58,3	61,0	62,6
Média	55,7	54,2	55,1	54,9	53,8	52,1	53,2

Tabela 10. Análise de variância do teste de redutase, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamentos	6	94,20751	15,70125	1,6799
Blocos	9	1348,98046	149,88671	16,0367**
Resíduo	54	504,70861	9,34645	
Total	69	1947,89660		

** Significativo ao nível de 0,01

tre os experimentos, apesar de se ter adotado sempre o mesmo procedimento. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os tratamentos, sugerindo que as temperaturas estudadas não afetaram o comportamento do microrganismo.

As Tabelas 1 e 6 (Apêndice) mostram os valores obtidos através do teste de Tukey, onde não se constatarem diferenças significativas na comparação das médias dos tratamentos. Entretanto, o "strain" *S. agalactiae* ATCC 13813 utilizado nos experimentos apresentou um tempo de redução do azul de metileno menor à medida que foram sendo aumentadas as temperaturas iniciais da amostra. Essa característica é própria do microrganismo como citado no MANUAL OF BERGEY'S (1974), onde a proximidade da temperatura ótima do seu desenvolvimento resulta no aumento da sua atividade.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 5,6414%.

A análise de variância para regressão Tabela 18. (Apêndice), mostra que esse microrganismo apresentou um comportamento linear. Como demonstra o Gráfico 5, os tempos de redução do corante em relação às temperaturas iniciais da amostra, decresceram linearmente com o aumento das temperaturas elegidas para o teste.

Segundo LOPES, SILVA FILHO e PORTO (1964) certos "strains" de *Streptococcus* causadores da mastite bovina não reduzem o azul de metileno, o qual exerce uma ação inibidora sobre os mesmos, o que poderá provocar uma diminuição da

Gráfico 5. Comportamento do *Streptococcus agalactiae* e ATCC 13813 e azul de metileno.

eficácia do teste, o que está em desacordo com o comportamento do "strain" utilizado nesse trabalho. Isto pode ter ocorrido porque não houve interferência de outros fatores, uma vez que o leite utilizado para os testes foi esterelizado em vapor fluente.

4.6. Streptococcus agalactiae e rezasurina (Tabelas 11 e 12)

Esse microrganismo na análise de variância demonstrou significância de 0,01 para os blocos.

No Apêndice (Tabelas 1 e 7) mostram os resultados obtidos para o teste de Tukey, não se verificando diferenças significativas na comparação das médias dos tratamentos.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 2,3503%.

Pela análise de variância para regressão Tabela 19 (Apêndice) e como demonstra o Gráfico 6, para esse microrganismo não houve significância em relação aos componentes estudados (1º e 2º graus), mostrando que a atividade desse microrganismo para redução da rezasurina é independente da temperatura inicial da amostra.

Tabela 11. Tempo de redução do corante, rezasurina, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	98,6	96,0	97,0	98,3	100,3	100,6	102,3
2	99,0	99,0	100,6	111,0	104,0	102,6	104,3
3	109,0	111,3	113,3	114,0	113,6	108,3	105,0
4	109,6	111,3	114,6	113,6	113,3	109,0	105,3
5	113,6	115,0	113,6	116,0	112,6	112,0	113,6
6	115,3	116,0	112,0	110,0	112,6	111,0	112,6
7	106,3	102,6	102,6	104,6	108,6	106,6	107,6
8	105,6	103,3	103,6	104,3	107,3	106,0	109,0
9	108,3	106,0	103,3	105,3	106,6	106,3	106,0
10	108,6	108,3	106,0	108,0	107,3	106,3	106,6
Média	107,3	106,8	106,6	108,5	108,6	106,8	107,2

Tabela 12. Análise de variância do teste de redutase, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamento	6	38,30712	6,38452	1,0009
Blocos	9	1342,58300	149,17588	23,3880**
Resíduo	54	344,42773	6,37829	
Total	69	1725,31787		

** Significativo ao nível de 0,01.

Gráfico 6. Comportamento do *Streptococcus agalactiae* e ATCC 13813 e rezasurina.

4.7. Streptococcus faecalis e azul de metileno

(Tabelas 13 e 14).

Os resultados da análise de variância demonstram significância de 0,01 para tratamentos e blocos. Isto implica que pelo menos dois experimentos diferiram, assim como, a temperatura da amostra no momento da inoculação do microrganismo afetou seu comportamento no processo de descoloração do azul de metileno.

No Apêndice (Tabelas 1 e 8) se observa pelas médias que, para as temperaturas de inoculação inferiores, praticamente não houve variação quanto ao tempo de descoloração pelo microrganismo, quando comparadas com as duas mais elevadas (30° e 35°C), embora tenha havido significância estatística entre os tratamentos a 30° e 35°C.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 7,3989%.

A análise de variância para regressão, Tabela 20 (apêndice) demonstrou que houve significância ao nível de 0,01 para tratamentos e componente de 1º e 2º grau, verificando-se pelo Gráfico 7, que o tempo de redução do corante foi praticamente constante até a temperatura de 15°C, apresentando uma diminuição à medida que a temperatura inicial da amostra foi se elevando e aproximando da faixa favorável ao desenvolvimento desse microrganismo.

Tabela 13. Tempo de redução do corante, azul de metileno, *Streptococcus faecalis* ITAL (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	19,0	17,0	16,3	16,0	14,0	13,0	10,0
2	19,3	20,0	19,3	19,6	19,0	16,6	12,0
3	18,0	16,6	17,6	16,0	15,0	12,6	13,3
4	19,0	16,6	18,0	18,0	18,0	16,3	15,3
5	19,3	19,6	18,3	18,3	18,3	17,0	18,3
6	21,3	18,6	17,6	19,0	18,0	18,3	17,3
7	19,0	16,3	18,3	19,3	18,3	16,6	13,0
8	18,0	16,0	17,6	18,6	17,6	18,0	16,0
9	19,0	16,3	18,3	19,3	18,3	16,6	13,0
10	18,0	16,0	17,6	18,6	17,6	18,0	16,0
Média	18,9	17,2	17,8	18,2	17,4	16,2	14,4

Tabela 14. Análise de variância do teste de redutase, *Streptococcus faecalis* ITAL e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamento	6	134,12992	22,35498	13,7618**
Blocos	9	79,88542	8,87615	5,4642**
Resíduo	54	87,71856	1,62441	
Total	69	301,73391		

** Significativo ao nível de 0,01

Gráfico 7. Comportamento do *Streptococcus faecalis* ITAL e azul de metileno.

4.8. Streptococcus faecalis e rezasurina (Tabelas 15 e 16)

Os resultados da análise de variância (Tabela 16) mostram significância ao nível de 0,01 para blocos, o mesmo não ocorrendo para os tratamentos, sugerindo que a temperatura inicial da amostra não interferiu no comportamento do microrganismo, embora tenha havido variação entre os experimentos.

De acordo com o Apêndice (Tabelas 1 e 9), não se verificaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 2,1319%.

Na Tabela 21 (Apêndice) são apresentados os resultados da análise de variância para regressão, onde se verifica não ter ocorrido significância nos comportamentos estudados, como mostra também o Gráfico 8, onde o valor médio geral dos experimentos (55,3285 minutos) é indicativo de que a temperatura inicial de inoculação da amostra realmente não interferiu no processo de redução do corante por esse microrganismo, ou seja, o tempo de redução da rezasurina pelo *S. faecalis* ITAL, foi independente da temperatura inicial da amostra no momento da inoculação.

Tabela 15. Tempo de redução do corante, rezasurina, *Streptococcus faecalis* ITAL (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	50,0	50,6	49,3	49,6	50,0	50,3	50,6
2	51,6	55,3	56,3	55,0	54,3	52,3	51,6
3	57,6	58,3	56,3	56,6	57,6	59,0	59,2
4	57,6	58,6	58,6	58,6	57,6	58,3	58,6
5	58,6	56,6	55,6	54,3	54,6	56,3	56,0
6	58,6	54,3	55,6	56,0	55,6	54,6	56,0
7	58,6	58,0	58,3	58,6	57,6	57,3	56,6
8	58,6	57,6	58,6	58,3	58,6	57,6	58,6
9	51,6	51,3	50,6	51,0	51,6	52,3	53,0
10	55,6	55,3	53,6	54,6	50,6	53,0	54,0
Média	55,8	55,5	55,2	55,2	54,8	55,1	55,4

Tabela 16. Análise de variância do teste de redutase, *Streptococcus faecalis* ITAL e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamento	6	6,66918	1,11153	0,7988
Blocos	9	536,93859	59,65984	42,8762**
Resíduo	54	75,13793	1,39144	
Total	69	618,74572		

** Significativo ao nível de 0,01

Gráfico 8. Comportamento do *Streptococcus faecalis* ITAL e re-zasurina.

4.9. Streptococcus lactis e azul de metileno

(Tabelas 17 e 18)

Pela análise de variância observa-se que houve significância ao nível de 0,05 de probabilidade para tratamentos, sugerindo que a temperatura influiu no comportamento do microrganismo, enquanto que para blocos o nível de significância foi de 0,01.

Pelos resultados obtidos (Tabelas 1 e 10) na comparação das médias (teste de Tukey), mostrados no apêndice verifica-se que as temperaturas de inoculação estudadas não interferiram com rigor no tempo de descoloração do azul de metileno por esse microrganismo, uma vez que a variação entre as médias foi muito pequena.

O coeficiente de variação ao nível de experimento foi de 1,5127%.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 22 (Apêndice) e o Gráfico 9, verifica-se que não houve significância para os componentes testados, assim pelo valor médio geral dos experimentos (157,0971 minutos) se concluiu que a temperatura inicial da amostra não influenciou o comportamento redutivo do *S. lactis* ITAL em relação ao corante.

Tabela 17. Tempo de redução do corante, azul de metileno, *Streptococcus lactis* ITAL (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	158,0	159,0	160,6	162,6	160,6	161,0	161,6
2	167,3	162,6	164,6	165,6	165,6	163,0	161,6
3	156,0	153,3	152,6	153,3	152,0	148,6	152,3
4	164,3	158,3	161,3	154,0	170,6	158,3	163,3
5	155,6	155,6	157,0	156,0	153,6	150,0	149,3
6	158,6	155,6	152,3	154,6	156,0	154,6	153,0
7	154,0	152,3	154,3	155,0	155,6	153,6	158,0
8	152,6	152,6	152,0	153,0	155,3	154,3	149,6
9	160,4	158,3	159,2	160,5	159,4	157,5	158,5
10	159,5	156,5	156,8	154,8	160,0	154,3	155,2
Média	158,6	156,4	157,0	156,9	158,8	155,5	156,2

Tabela 18. Análise de variância do teste de redutase, *Streptococcus lactis* ITAL e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamento	6	92,14550	15,35758	2,7193*
Blocos	9	1027,13379	114,12597	20,2078**
Resíduo	54	304,97070	5,64760	
Total	69	1424,25000		

* Significativo ao nível de 0,05

** Significativo ao nível de 0,01

Gráfico 9. Comportamento do *Streptococcus lactis* ITAL e azul de metileno.

4.10. Streptococcus lactis e rezasurina

(Tabelas 19 e 20)

A análise da variância (Tabela 20) mostra que para tratamentos e blocos o teste F foi significativo ao nível de 0,01 significando que pelo menos dois experimentos se comportaram diferentemente e que a temperatura de inoculação afetou a atividade de descoloração da rezasurina pelo microrganismo.

De acordo com o Apêndice (Tabelas 1 e 11), os resultados do teste de Tukey demonstram que somente o tratamento à 35°C interferiu no tempo de redução da rezasurina, quando comparado com as demais temperaturas estudadas, mesmo assim não se apresentando com tanto rigor.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 0,6616%.

No Apêndice (Tabela 23), são mostrados os resultados da análise de variância para regressão onde se verifica significância ao nível de 0,01 para tratamentos e componente do 2º grau. Isto pode ser observado no Gráfico 10, onde o maior tempo de redução ocorreu quando a amostra foi inoculada à 20°C e os menores à 5°C e 35°C, embora tenha havido para as demais temperaturas de inoculação estudadas, variações muito pequenas.

Tabela 19. Tempo de redução do corante, rezasurina, *Streptococcus lactis* ITAL (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	258,3	262,6	258,6	259,3	262,3	256,0	251,3
2	249,3	250,3	250,6	251,3	253,6	255,3	253,6
3	250,6	250,3	251,3	251,0	252,6	249,6	249,6
4	248,6	249,3	249,6	249,6	251,0	250,3	248,3
5	251,6	253,6	252,3	252,6	251,3	253,3	250,0
6	246,3	245,3	244,0	246,3	249,6	249,0	248,6
7	252,8	255,4	253,0	256,2	258,6	256,1	252,3
8	249,4	249,5	250,3	250,2	251,5	249,6	248,3
9	248,9	249,6	249,4	249,6	249,6	251,4	249,2
10	251,8	253,3	252,2	254,5	253,9	253,0	249,6
Média	250,7	251,9	251,1	252,0	253,3	252,3	250,0

Tabela 20. Análise de variância do teste de redutase, *Streptococcus lactis* ITAL e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamento	6	73,37500	12,22916	4,4104**
Blocos	9	635,64453	70,62717	25,4715**
Resíduo	54	149,73046	2,77278	
Total	69	858,75000		

** Significativo ao nível de 0,01

Gráfico 10. Comportamento do *Streptococcus lactis* ITAL e re-zasurina.

4.11. *Pseudomonas fluorescens* e azul de metileno

(Tabelas 21 e 22)

A análise de variância (Tabela 22), apresenta significância ao nível de 0,01 para tratamentos e blocos, demonstrando a influência da temperatura de inoculação no tempo de redução do corante por essa bactéria e uma variação entre os tratamentos.

Os resultados do teste de Tukey, apresentados no Apêndice (Tabelas 1 e 12) pode-se deduzir que embora em ordem decrescentes, as temperaturas de 5°, 10° e 15°C interferiram na redução do azul de metileno quando comparada com as médias dos experimentos à 20°, 25°, 30° e 35°C. Tratando-se de um microrganismo psicrófilo sua tendência seria em reduzir primeiramente o corante dos experimentos efetuados nas temperaturas inferiores; a estatística nos mostra assim, um comportamento não comum desse microrganismo, isto é, tendo reduzido o corante à forma leuco nas temperaturas maiores.

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 3,0886%.

No Apêndice (Tabela 24) a análise de variância para regressão mostra a significância de 0,01 para componente do 1º grau, o que significa um comportamento linear do tempo de redução, como mostra o Gráfico 11. Já que se obteve um tempo de redução menor, as temperaturas de inoculação maiores (25°, 30° e 35°C) e valores maiores à 5°, 10° e 15°C e, em se tra

Tabela 21. Tempo de redução do corante, azul de metileno, *Pseudomonas fluorescens* ITAL (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	227,8	229,8	219,3	219,6	216,0	251,8	233,1
2	189,0	181,4	183,0	177,9	180,0	171,8	177,8
3	194,3	194,3	193,6	193,0	192,3	184,6	189,0
4	236,4	238,8	241,6	226,8	229,8	237,9	231,8
5	228,3	228,3	219,3	211,3	219,6	210,6	210,0
6	220,3	220,6	217,3	204,0	204,3	206,3	209,1
7	262,0	265,0	266,3	260,0	265,6	260,6	251,6
8	253,6	253,3	241,9	240,0	234,0	231,6	225,0
9	225,3	222,3	210,6	201,0	197,3	197,0	196,3
10	210,0	204,6	199,6	198,6	202,0	201,0	209,0
Média	224,6	223,8	219,2	213,2	214,0	215,3	213,2

Tabela 22. Análise de variância do teste de redutase, *Pseudomonas fluorescens* ITAL e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamento	6	1474,90234	245,81705	5,4385**
Blocos	9	36833,64067	4092,62673	90,5466**
Resíduo	54	2440,75195	45,19911	
Total	69	40749,29495		

** Significativo ao nível de 0,01

Gráfico 11. Comportamento da *Pseudomonas fluorescens* ITAL e azul de metileno.

tando de um microrganismo psicrófilo esse "strain" com o ótimo de atividade à 21°C, mas que pode se desenvolver à temperaturas inferiores, o esperado seria um tempo de redução menor às temperaturas inferiores, aumentando esse intervalo à medida que elas se elevassem, isto sugere um comportamento não usual para o "strain" em estudo.

O tempo maior de redução do azul de metileno apresentado por esse "strain" de *P. fluorescens* ITAL, está de acordo com o descrito por SCHNERR (1949), onde ele afirma que as espécies proteolíticas como a *P. fluorescens* apresentam pequeno poder de redução.

4.12. *Pseudomonas fluorescens* e rezasurina

(Tabelas 23 e 24)

A temperatura influiu no comportamento da bactéria com relação ao tempo de descoloração da rezasurina, visto que a análise de variância mostrou significância ao nível de 0,01 para tratamentos e blocos (Tabela 24).

No Apêndice (Tabelas 1 e 13) inserem-se os resultados do teste de Tukey, podendo-se concluir que a variação na diferença entre as médias para as sete temperaturas testadas foram muito pequenas, exceto à 5°C, onde ocorreu um tempo de redução do corante bastante superior, colocando-se fora dos padrões normais para bactérias psicrófilas.

Tabela 23. Tempo de redução do corante, rezasurina, *Pseudomonas fluorescens* ITAL (minutos).

Bloco Nº	Temperatura da amostra (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	1052,1	1035,3	1032,6	1028,8	1017,9	1004,4	1019,9
2	1068,6	1062,2	1097,2	1058,8	1095,9	1037,0	8062,8
3	1041,6	983,4	1020,0	974,0	975,6	1005,1	995,0
4	1032,6	1030,2	1026,9	997,1	998,8	1015,6	1001,4
5	1031,3	994,4	977,0	992,4	989,8	1004,0	1041,2
6	1049,3	984,1	990,8	985,8	982,1	984,1	1011,9
7	1033,3	1065,1	1043,1	1027,2	1015,1	1044,6	1050,6
8	1111,3	1080,0	1088,9	1058,1	1061,8	1066,8	1056,4
9	1085,3	1074,2	1092,6	1071,4	1073,4	1060,4	1076,1
10	1098,6	1105,0	1107,3	994,4	1015,6	1009,6	1033,3
Média	1060,3	1043,7	1047,6	1018,7	1022,5	1023,1	1034,8

Tabela 24. Análise de variância do teste de redutase, *Pseudomonas fluorescens* ITAL e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Tratamento	6	14331,56250	2388,59375	5,9861**
Blocos	9	63131,43753	7014,60416	17,5796**
Resíduo	54	21546,93752	399,01736	
Total	69	99009,93759		

** Significativo ao nível de 0,01

O coeficiente de variação a nível de experimento foi de 1,9283%.

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 25 (Apêndice), se observa que houve significância para os componentes de 1º e 2º grau. O Gráfico 12, construído a partir dos dados do componente do 2º grau, mostra que o menor tempo de redução do corante encontrado, foi para a temperatura de inoculação de 25°C, a qual se aproxima da temperatura ótima para o seu desenvolvimento, e que o tempo de redução aumentou com o aumento da temperatura de inoculação.

Na Tabela 26 (Apêndice), são mostradas as médias dos tempos de redução para os dois corantes estudados e as seis espécies bacterianas. Pode-se verificar que o *Streptococcus lactis* ITAL, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Escherichia coli* IZ 923, *Staphylococcus aureus* IZ 1974 e *Streptococcus faecalis* ITAL, tiveram um tempo de redução praticamente dobrado em relação ao corante 2 (rezasurina), enquanto que para o "strain" de *Pseudomonas fluorescens* ITAL, o tempo de redução da rezasurina (corante 2) foi quase cinco vezes superior àquele do corante 1 (azul de metileno), enquanto para o *Streptococcus faecalis* ITAL a variação no tempo de redução do corante 1 para a rezasurina (corante 2) foi superior a tres vezes. Esse tipo de comportamento pelos microrganismos em relação ao azul de metileno e a rezasurina, é provavelmente decorrência da diferença do mecanismo de redução dos dois corantes, uma vez que na redução do azul de metileno

Gráfico 12. Comportamento da *Pseudomonas fluorescens* ITAL e rezasurina.

há transferência do hidrogênio oriundo dos constituintes do leite e metabólitos bacterianos em uma reação reversível, resultando-se a forma leuco (incolor) e para a rezasurina duas reações envolvem o processo, sendo primeiramente a redução da rezasurina no composto denominado resorufina através de uma reação irreversível e posteriormente a hidroresorufina (forma reversível) que é incolor (leuco).

5. CONCLUSÕES

Os resultados das análises dos dados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. Os microrganismos ensaiados se comportaram diferentemente em relação à redução dos corantes azul de metileno e rezasurina e à temperatura inicial da amostra.
2. Para os microrganismos *S. agalactiae* ATCC 13813 e *S. faecalis* ITAL, o tempo de redução do corante rezasurina foi independente da temperatura inicial da amostra, enquanto que para *S. lactis* ITAL esse mesmo comportamento se verificou com o corante azul de metileno.
3. Das espécies investigadas o *S. agalactiae* ATCC 13813 foi a única que apresentou variação linear do tempo de redução do azul de metileno com o aumento da temperatura inicial da amostra, o que é compatível com as características da espécie.

4. O comportamento dos demais microrganismos na redução dos dois corantes empregados em relação à temperatura inicial da amostra foi bastante irregular não concordando com as características normais das espécies.
5. Dadas as variações encontradas na capacidade das espécies de microrganismos empregados, em reduzir os corantes, azul de metileno e rezasurina, os dados do presente estudo não permitem apontar nenhum dos corantes como o mais adequado para o teste de reductase, quando se varia a temperatura inicial da amostra.

6. LITERATURA CITADA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1972. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 13^a ed. American Public Health Association, Inc. Washington, D.C. 345p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1978. Standard methods for the Examination of Dairy Products. 14^a ed., Washington, D.C., p.187-195.

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

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

ASHTON, T.R., 1950. Some Bacteriological Aspects of the Deterioration of Pasteurized Milk. Journal Dairy Res., London, 17: 261-287.

BARKWORTH, H.; J.O. IRWIN e A.T.R. MATTICK, 1942. The Plate Count and Methylene Blue Reduction Test Applied to milk. J. of Dairy Res., Kent., 265-314.

- BABEL, F.J., 1953. Activity of bacteria and enzymes in raw milk held at 4,4°C. J. Dairy Sci., 36: 562.
- BERGDOLL, M.S., 1969. Bacterial Toxins in Food. Fd. Technol. Champaign, 23: 530-533.
- BERMÚDEZ, J.; M. BONILLA; L.P. DEL-BAGLIVI e M. LABORDE, 1976. Estudio sobre la Calidad Higiénica de la Leche Cruda Recibida en Plantas Lecheras. Revista Latinoamericana de Microbiología, Uruguay, 18(4): 175-178.
- BRASIL. Ministério da Agricultura - Secretaria de Inspeção de Produto Animal - Divisão de Leite e Derivados, 1980. Boletim do Leite, 619: 12-14.
- BRASIL. Ministério da Agricultura - Secretaria da Inspeção de Produto Animal - Divisão de Leite e Derivados, 1980. Boletim do Leite, 620: 10-12.
- BRASIL. Ministério da Agricultura - Secretaria da Inspeção de Produto Animal - Divisão de Leite e Derivados, 1980. Boletim do Leite, 621: 28-30.
- BRASIL. Ministério da Agricultura - Secretaria de Inspeção de Produto Animal - SIPA - Serviço de Inspeção Federal, 1983. Boletim do Leite, 654: 1-2.
- BRYAN, F.L., 1973. Diseases transmitted by Foods (A classification and Summary). U.S. Depart. of Health, Education and Welfare, Public. Health Service, 63p.
- BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, 1974. Determinative Bacteriology Bergey's Manual. 8ª ed. The Williams e Wilkins Company. Baltimore. 1268p.

- CHALMERS, C.H., 1938. The Methylene Blue Reduction Test and the Keeping Quality of Milk. J. of Dairy Res., Leeds, 9: 351-355.
- DABBAH, R. et alii, 1969. Evaluation of the Rezasurin Reduction One - Hour Test for Grading Milk Intended for Manufacturing Purposes. J. of Milk and Food Technology, Beltsville, 32(2): 44-48.
- DEMETER, K.J., 1969. Lactobacteriologia, Zaragoza, España. Acribia. 33lp.
- DEFLEURS, M. e M. DEFLEURS, 1977. Évaluation de la Teneur en Germes Gran Négatifs des Laits et ses Conséquences. Le lait, France, 567: 375-383.
- DONNELLY, C.B. et alii, 1968. Production of enterotoxin A in milk. Appl. Microbiol., 16: 917-924.
- EDDY, B.P., 1960. The use of term psychrotrophic. J. Appl. Bacteriol., 23: 189-190.
- ELLIKER, P.R. et alii, 1964. Psychrophilic bacteria and keeping quality of pasteurized dairy products. J. Milk Food Technol., 27: 69-75.
- FOSTER, E.M. et alii, 1957. Microbiologia de la leche. Editorial Herrero S.A., México, D.F. 490p.
- FOSTER, E.M. et alii, 1957. Dairy Microbiol., New Jersey, Prentice Hall, p.128-130.

- FORD, H.F. e F.J. BABEL, 1969. Milk quality problems associated with present day marketing. J. Milk Food Technol., 22: 141-144.
- FRANKLIN, J.G., 1965. The effect of Raw Milk Quality on the keeping Quality of Pasteurized Milk. Dairy Industry, 30 (1): 46-50.
- FRAZIER, W.C., 1967. Food Microbiol., Mc Graw-Hill Book Company. New York.
- FRANK, J.P. e E.H. MARTH, 1978. Survey of Soft and Semisoft Cheese for Presence of Fecal Coliforms and Serotypes of Enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Food Protect., 41: 198-200.
- GROSSKOPF, J.C. e W.C. HARPER, 1969. Role of psychrophilic sporeformers in long-life milk. J. Dairy Sci, 52: 897.
- HAMMER, B.W., 1948. Dairy Bacteriol., 3ª ed., New York. John Williy. 598p.
- HISCOX, E.R. et alii, 1932. J. Dairy Res., 4: 120. In: CHALMERS, C.H., 1938. The Methylene Blue Reduction Test and the Keeping Quality of Milk. Journal Dairy Res, Leeds, 9: 351-355.
- HOY & BRAZ, 1938. Proc. Soc. Agric. Bact Abstract. In: BARKWORTH, H. e J.O. IRWIN e A.T.R. MATTICK, 1942. The Plate Count and Methylene Blue Reduction Test Applied to Milk. Journal Dairy Res., Kent., 265-314.
- HOBBIGER, A., 1962. Observations on the effect of machine milking on the higgienic quality of raw milk. Int. Dairy Congr. A., p.517-520.

- HUCKER, G.J., 1954. Low temperature organisms in frozen vegetables. Food Technol., 8: 79-108.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1974. Methods for Assessing the Bacteriological Quality of Cooled Bulk Milk from the Farm. Annual Bulletin-Document nº 83: 1-19.
- JAWETZ, E. et alii, 1970. Microbiologia Médica. 2th. ed., Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. p.175-177.
- JOHNS, 1930. Sci. Agric. 11; 171. In: BARKWORTH, H. ; J.O. IRWIN e A.T.R. MATTIC, 1942. The Plate Count and Methylene Blue Reduction Test Applied to Milk. Journal Dairy Res., Kent., 265-314.
- JUFFS, H.S. e F.J. BABEL, 1975. Inhibition of psychrotrophic Bacteria by latic cultures in milk stored at low temperature. J. Dairy Sci., 58: 1612-1619.
- KIRÁLY, Z.; Z. KLEMENT; F. SOLYMOSY e J. VOROS, 1974. Methods in plant pathology. 2ª ed. New York, Elsevier Scientific Publishing Company. 509p.
- LEISINGER, T. e R. MARGRAFF, 1979. Secondary Metabolites of the Fluorescent Pseudomonads. Microbiological Reviews, 43 (3): 434-437.
- LOPES, C.F.; SILVA FILHO, F.S. e PORTO, R., 1964. Contribuição para o estudo da redutase do leite pelo emprego da rezasurina e do azul de metileno. Bol. Ind. An., 22: 145 - 151.
- LUCK, H., 1972. Bacteriological quality tests for bulk cooled milk. A review. Dairy Sci. Abst., 34: 101-122.

- MARTH, E.H. e W.C. FRAZIER, 1957. Bacteriology of milk held at farm bulk cooling tank temperatures III. Psychrophiles found and their growth. J. Milk Food Technol., 20: 93-99.
- MARIER, R., et alii, 1973. An out Break of Enteropathogenic-*Escherichia coli* Foodborne Disease traced to Imported French Cheese. Lancet., 2: 1376-1378.
- McKAY, L.L. e K.A. BALDWIN, 1973. Induction of prophage in *Streptococcus lactis* C₂ by ultraviolet irradiation. Applied Microbiol., 25(4): 682-684.
- MERCK & Co. Inc. The Merck Index, 1960. New York. Rahway.
- MEHLMAN, I.J. et alii, 1974. Problems in the Recovery and identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* from Food. J. Milk Food Technol., 37: 350-356.
- MEHLMAN, I.J. et alii, 1976. Pathogenicity of *Escherichia coli* Recovered from Food. J. Ass. off Anal. Chem., 59: 67-80.
- MORSE, P.M. et alii, 1968. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk. III. Increase in count, from cow to bulk tank and effects of refrigerated storage and preliminary incubation. J. Dairy Sci., 51: 1192-1206.
- MORITA, R.Y., 1975. Psychrophilic Bacteria. Bacteriological Reviews. Printed. Copyright American Society of Microbiology, 39(2): 144-167.

NADER FILHO, A.; R.P. SCHOCKEN-ITURRINO e S.P. FUKUDA, 1983. Estudo Comparativo entre a Prova de Redutase, Contagem Padrão em Placas e Contagem Leucocitária. I. Leite "In Natura" Procedente de Vacas Reagentes ao California Mastitis Test (CMT). Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 38(229): 37-40.

NADER FILHO, A.; R.P. SCHOCKEN-ITURRINO e S.P. FUKUDA, 1983. Estudo Comparativo entre a Prova de Redutase, Contagem Padrão em Placas e Contagem Leucocitária. II. Leite "In Natura" Procedente de Vacas não Reagentes ao California Mastitis Test (CMT). Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 38(230): 19-22.

NICHOLS & EDWARDS, 1936. J. Dairy Res., 7, 258. In: BARKWORTH, H.; J.O. IRWIN; A.T.R. MATTICK, 1942. The Plate Count and Methylene Blue Reduction Test Applied to Milk. Journal Dairy Res., Kent., 265-314.

OLSEN, R.H. e J.J. JEZESKI, 1963. Some effects of carbon source, aeration and temperature on growth of a psychrophilic strain of *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Bacteriol., Baltimore, 86(3): 429-433.

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

OTSUKA, G. e T. NAKAE, 1969. Rezasurin Test Paper Method for Determining the Sanitary Quality of Raw Milk. J. Dairy Science, 52: 2041-2044.

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

- PATEL, G.B. e G. BLANKENAGEL, 1972. Bacteria count of raw milk, and flavour of the milk after pasteurization and storage. J. Milk Food Technol., 35: 203.
- PEDRAZA, C.; J.J. ROMERO e A.H. ARGREAVES, 1978. Efecto del paso de la leche por el equipo de ordeño mecánico, del enfriamiento y del tiempo de almanecaye, sobre su calidad bacteriológica. Agricultura Técnica, Chile, 38: 156-160.
- PELCZAR, M.; R. REID e E.C.S. CHAN, 1981. Microbiologia. Ed. Mc Graw-Hill do Brasil, vol. I, 1065p.
- PERROUD, M., 1983. L'Activité Oxydo-Réductrice. La Technique Laitière, Elnor, 973: 43-44.
- RENNER, E.; O. KANDLER e F. KIERMEIR, 1962. Microflora of Milk in Hand Milking Compared with Machine Milking. Dairy Sci. Abs., 30(4): nº 1328.
- ROGICK, F.A. e L.H. BURGWARD, 1952. Some factors which contribute to the psychrophilic count in raw milk. J. Milk Food Technol., 15: 181-195.
- RYDER, R.W. et alii, 1976. Infantile Diarrhea produced by Heat-Stable Enterotoxigenic *Escherichia coli*. New Eng. J. Med., 295: 849-853.
- SACK, R.B., 1975. Human Diarrheal Disease Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol., 28: 333-353.
- SCHONHERR, W., 1959. Manual Practico de Analises de Leche. Zaragoza, España. Acribia. p.83-85.

- SMYTHE, V.R., 1960. Sources of Milk Contamination of Farms. Dairy Sci. Abs, 23(3): nº 3926.
- SMITH, W.H., 1964. Principles of Biochemistry. 4^a ed., New York. McGraw-Hill Book Company. International Stredent Ediction. 308p.
- SOLBERG, P. et alii, 1974. Methods for Assessing the Bacteriological Quality of Cooled Bulk Milk from the Farm. International Dairy Federation Annual Bulletin, 83: 1-19.
- SUDARSANAM, T.S.; R.N. SINHA e V.K. NAMBU DRIPAD, 1978. Relationship Between Methylene Blue, Rezasurin and Nitrato Reduction Times of Fresch and Stored Pasteurised Milk. Indian Journal Dairy Science, Karnal, 31(2): 179-180.
- TAKAHASHI, I. e C.K. JOHNS, 1959. *Staphylococcus aureus* in Cheddar Cheese. J. Dairy Sci., 42: 1032-1037.
- THOMAS, S.B.; J.M. GRIFFITHS e J.B. FOUKES, 1961. The Psychrophilic colony count of Milk. Dairy Engng, 78: 49.
- THARKE, G.S. e V.K.N. NAMBU DRIPAD, 1962. Proc. XVI Int. Dairy Cong. C.: 921. In: T.E. SUDARSANAM; R.N. SINHA e V.K.N. NAMBU DRIPAD, 1978. Relationship Between Methylene Blue, Rezasurin and Nitrato Reduction Times of Fresch and Stored Pasteurized Milk. Indian Journal Dairy Science, Karnal, 31(2): 179-180.
- THOMAS, S.B. et alii, 1966. The significance of psychrotrophic bacteria in raw milk. Dairy Ind., 31: 27-32.
- THOMAS, S.B., 1969. Methods of Assessing the Psychrotrophic Bacterial Content of Milk. Journal Applied Bacteriol., Wales, 32: 269-296.

- TROLLER, J.A., 1976. Staphylococcal growth and Enterotoxin production factors for control. J. Milk Food Technol., 39: 499-503.
- UPADHYAY, J. e J.L. STOKES, 1962. Anaerobic growth of psychrophilic bacteria. Journal of Bacteriol., 23(2): 270-275.
- VEISSEYRE, R., 1972. Lactologia Técnica. Zaragoza, España. Acribia. 643p.
- ZACHARIAH, P. e J. LISTON, 1973. Temperature adaptability of psychrotrophic *Pseudomonas*. Appl. Microbiol., 26: 437-438.
- WATROUS, G.H. et alii, 1971. A survey of the actual and potential bacterial keeping quality of pasteurized milk from 50 Pennsylvania dairy plants. J. Milk Food Technol., 34: 145.
- WILSON, 1936. The bacteriological grading of milk. Sep. Rep. Ser. Med. Res. Coun. Lond. nº 206. In: BARKWORTH, H, J.O. IRWIN e A.T.R. MATTICK, 1942. The Plate Count and Methylene Blue Reduction Test Applied to Milk. Journal Dairy Res., Kent., 265-314.
- WITTER, L.D., 1961. Psychrophilic Bacteria. A. Review. J. Dairy Sci., 44: 983-1015.

A P Ê N D I C E

Tabela 1. Resultados do teste de Tukey na comparação das médias dos tratamentos incluídos nos experimentos estudados.

Microrganismo/corante	DMS (0,01) *	DMS (0,05) *
<i>E. coli</i> /IZ 923/azul de metileno	14,8142	12,4211
<i>E. coli</i> IZ 923/rezasurina	6,6398	5,5672
<i>S. aureus</i> IZ 1974/azul de metileno	5,0358	4,2223
<i>S. aureus</i> IZ 1974/rezasurina	3,5215	2,9526
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813/azul de metileno	4,	4,1899
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813/rezasurina	4,1	3,4613
<i>S. faecalis</i> ITAL/azul de metileno	2,0833	1,7467
<i>S. faecalis</i> ITAL/rezasurina	1,9281	1,6166
<i>S. lactis</i> ITAL/azul de metileno	3,8845	3,2570
<i>S. lactis</i> ITAL/rezasurina	2,7218	2,2821
<i>P. fluorescens</i> ITAL/azul de metileno	10,9893	9,2141
<i>P. fluorescens</i> ITAL/rezasurina	32,6514	27,3769

* níveis de significância

Tabela 2. Média dos tratamentos do experimento com *E. coli* IZ 923 e azul de metileno em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
4	20	249,0399
5	25	248,1299
6	30	246,5599
3	15	245,3999
2	10	240,8099
1	5	239,5999
7	35	238,6599

Tabela 3. Média dos tratamentos do experimento com *E. coli* IZ 923 e rezasurina em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
7	35	498,8999
6	30	494,6399
5	25	493,5999
4	20	489,1099
3	15	486,1599
2	10	485,2599
1	5	480,9999

Tabela 4. Média dos tratamentos do experimento com *S. aureus* IZ 1974 e azul de metileno em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
1	5	134,2800
2	10	131,7600
6	30	124,4099
7	35	123,8800
4	20	123,7899
3	15	123,1899
5	25	123,0099

Tabela 5. Média dos tratamentos do experimentos com *S. aureus* IZ 1974 e rezasurina em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
1	5	123,7599
2	10	122,6599
7	35	121,5599
3	15	121,2999
6	30	120,3899
4	20	120,1799
5	25	119,4599

Tabela 6. Média dos tratamentos do experimento com *S. agalactiae* ATCC 13813 e azul de metileno em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
1	5	55,7499
3	15	55,1400
4	20	54,9799
2	10	54,2599
5	25	53,8799
7	35	53,2599
6	30	52,0699

Tabela 7. Média dos tratamentos do experimento com *S. agalactiae* ATCC 13813 e rezasurina em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
5	25	108,6199
4	20	108,5099
1	5	107,3899
7	35	107,2300
2	10	106,8800
6	30	106,8699
3	15	106,6599

Tabela 8. Média dos tratamentos do experimento com *S. faecalis* ITAL e azul de metileno, em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
1	5	18,9900
4	20	18,2699
3	15	17,8899
5	25	17,4099
2	10	17,2999
6	30	16,2999
7	35	14,4199

Tabela 9. Média dos tratamentos do experimento com *S. faecalis* ITAL e rezasurina, em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
1	5	55,8399
2	10	55,5899
7	35	55,4199
3	15	55,2799
4	20	55,2599
6	30	55,0999
5	25	54,8099

Tabela 10. Média dos tratamentos do experimento com *S. lactis* ITAL e azul de metileno, em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
5	25	158,8699
1	5	158,6299
3	15	157,0699
4	20	156,9399
2	10	156,4099
7	35	156,2399
6	30	155,5199

Tabela 11. Média dos tratamentos do experimento com *S. lactis* ITAL e rezasurina, em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
5	25	253,3999
6	30	252,3599
4	20	252,0599
2	10	251,9199
3	15	251,1299
1	5	250,7599
7	35	250,0799

Tabela 12. Média dos tratamentos do experimento com *P. fluorescens* ITAL e azul de metileno, em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
1	5	224,6999
2	10	223,8399
3	15	219,2499
6	30	215,3199
5	25	214,0899
7	35	213,2699
4	20	213,2199

Tabela 13. Média dos tratamentos do experimento com *P. fluorescens* ITAL e rezasurina, em ordem decrescente.

Tratamento	°C	Médias
1	5	1060,3999
3	15	1047,6399
2	10	1043,7899
7	35	1034,8599
6	30	1023,1599
5	25	1022,5999
4	20	1018,7999

Tabela 14. Análise de variância para regressão - *E. coli* IZ 923 e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	1090,1	181,69	2,2120	100,0000
Componente 1º grau	1	46,495	46,495	0,5660	4,2649
Componente 2º grau	1	869,25	869,25	10,5826**	79,7343
Desvio Regr.	4	174,43	43,609	0,5309	16,0009
Resíduo	54		82,138		

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 15. Análise de variância para regressão - *E. coli* IZ 923 e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	2324,5	387,42	23,4787**	100,0000
Componente 1º grau	1	2280,0	2280,0	138,1747**	98,0848
Componente 2º grau	1	1,7009	1,7009	0,1030	0,0731
Desvio Regr.	4	42,826	10,706	0,6488	1,8423
Resíduo	54		16,500		

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 16. Análise de variância para regressão - *S. aureus* IZ 1974 e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	1297,0	216,18	22,7770**	100,0000
Componente 1º grau	1	758,34	758,34	79,8991**	58,4646
Componente 2º grau	1	387,32	387,32	40,8088**	29,8611
Desvio Regr.	4	151,42	37,856	3,9885**	11,6741
Resíduo	54		9,4912		

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 17. Análise de variância para regressão - *S. aureus* IZ 1974 e reza-surina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	134,30	22,384	4,8228**	100,0000
Componente 1º grau	1	60,171	60,171	12,9641**	44,8014
Componente 2º grau	1	66,304	66,304	14,2855**	49,3679
Desvio Regr.	4	7,8303	1,9575	0,4217	5,8301
Resíduo	54		4,6413		

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 18. Análise de variância para regressão - *S. agalactiae* ATCC13813 e azul e metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	94,205	15,700	1,6798	100,0000
Componente 1º grau	1	61,382	61,382	6,5675*	65,1587
Componente 2º grau	1	44,344	0,44344	0,0474	0,4707
Desvio Regr.	4	32,378	8,0946	0,8660	34,3703
Resíduo	54		9,3464		

* Significativo ao nível de 0,05

Tabela 19. Análise de variância para regressão - *S. agalactiae* ATCC 13813 e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	38,300	6,3833	1,0007	100,0000
Componente 1º grau	1	0,76128	0,76128	0,1193	1,9876
Componente 2º grau	1	5,4724	5,4724	0,8579	14,2882
Desvio Regr.	4	32,065	8,0164	1,2568	83,7224
Resíduo	54		6,3782		

Tabela 20. Análise de variância para regressão - *S. faecalis* ITAL e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	134,12	22,354	13,7618**	100,0000
Componente 1º grau	1	93,612	93,612	57,6285**	69,7927
Componente 2º grau	1	16,943	16,943	10,4304**	12,6321
Desvio Regr.	4	23,573	5,8933	3,6279*	17,5750
Resíduo	54		1,6244		

* Significativo ao nível de 0,05

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 21. Análise de variância para regressão - *S. faecalis* ITAL e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	6,6653	1,1108	0,7983	100,0000
Componente 1º grau	1	2,6228	2,6228	1,8850	39,3511
Componente 2º grau	1	2,9642	2,9642	2,1303	44,4732
Desvio Regr.	4	1,0781	0,26953	0,1937	16,1755
Resíduo	54		1,3914		

Tabela 22. Análise de variância para regressão - *S. lactis* ITAL e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	92,122	15,353	2,7186*	100,0000
Componente 1º grau	1	18,258	18,258	3,2328	19,8192
Componente 2º grau	1	0,1801	0,1801	0,0318	0,1955
Desvio Regr.	4	73,684	18,421	3,2617*	79,9852
Resíduo	54		5,6476		

* Significativo ao nível de 0,05

Tabela 23. Análise de variância para regressão - *S. lactis* ITAL e reza-surina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	73,312	12,218	4,4066**	100,0000
Componente 1º grau	1	0,44003	0,44003	0,1586	0,6002
Componente 2º grau	1	37,002	37,002	13,3447**	50,4712
Desvio Regr.	4	35,873	8,9683	3,2344*	48,9318
Resíduo	54		2,7727		

* Significativo ao nível de 0,05

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 24. Análise de variância para regressão - *P. fluorescens* ITAL e azul de metileno.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	1474,8	245,81	5,4384*	100,0000
Componente 1º grau	1	1139,6	1139,6	25,2147**	77,2732
Componente 2º grau	1	162,53	162,53	3,5960	11,0203
Desvio Regr.	4	172,65	43,164	0,9549	11,7064
Resíduo	54		45,199		

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 25. Análise de variância para regressão - *P. fluorescens* ITAL e rezasurina.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	R ²
Tratamento	6	14330,0	2388,3	5,9856**	100,0000
Componente 1º grau	1	7295,0	7295,0	18,2825**	50,9068
Componente 2º grau	1	4314,8	4314,8	10,8136**	30,1100
Desvio Regr.	4	2720,3	680,09	1,7044	18,9834
Resíduo	54		399,01		

** Significativo ao nível de 0,01

Tabela 26. Médias do tempo de redução dos corantes: azul de metileno (1) e rezasurina (2).

Microrganismos	Corantes	Temperatura de inoculação (°C)						Média
		5	10	15	20	25	30	
<i>E. coli</i>	1	239,6	240,8	255,4	249,0	248,1	246,6	238,7
IZ 923	2	481,0	485,3	486,2	489,1	493,6	494,6	498,9
<i>S. aureus</i>	1	134,3	131,8	123,2	123,8	123,0	124,4	123,9
IZ 1974	2	123,8	122,6	121,2	120,1	119,5	120,3	121,6
<i>S. faecalis</i>	1	18,9	17,2	17,8	18,2	17,4	16,2	14,4
ITAL	2	55,8	55,5	55,2	55,2	54,8	55,1	55,4
<i>S. agalactiae</i>	1	55,7	54,2	55,1	54,9	53,8	52,1	53,2
ATCC 13813	2	107,3	106,8	106,6	108,5	108,6	106,8	107,2
<i>S. lactis</i>	1	158,6	156,4	157,0	156,9	158,8	155,5	156,2
ITAL	2	250,7	251,9	251,1	252,0	253,3	252,3	250,0
<i>P. fluorescens</i>	1	224,6	223,8	219,2	213,2	214,0	215,3	213,2
ITAL	2	1060,3	1043,7	1047,6	1018,7	1022,5	1023,1	1034,8
								1035,8