

INVESTIGAÇÕES MICROBIOLÓGICAS SOBRE MANTEIGAS (*)

ARIOSTO BÜLLER SOUTO E HÉLIO MARTINS

Biologistas do Instituto Adolfo Lutz.

INTRODUÇÃO

São de três diferentes categorias os microorganismos eventualmente encontrados no decurso dos exames bacteriológicos da manteiga, a saber: 1.º) aqueles que desempenham papel no preparo da mesma como agentes de fermentação, 2.º) aqueles que são ativos produtores da deterioração do produto e indicadores das falhas técnicas de manipulação e 3.º) aqueles que podem exercer ação patogênica.

Entre os diferentes microorganismos empregados na indústria da manteiga, alguns são dotados da propriedade de conferir aroma especial ao produto sendo particularmente importantes neste grupo o *Micrococcus-butyri-aroma-faciens* o *Bacterium aromaticus-butyri*, o *Streptococcus citrovorus* e o *Streptococcus lactis-cremoris*. Sabido hoje, que o aroma peculiar à manteiga está na dependência estrita do seu conteúdo em acetilmetilcarbinol e de seu derivado, o diacetil, numerosas pesquisas têm sido conduzidas com o fim de determinar a participação das bactérias na produção dessas substâncias aromatizantes. Enquanto que a produção do acetilmetilcarbinol e do seu derivado diacetil é característico de grande número de germes (Reação de Voges-Proskauer positiva para o acetilmetilcarbinol), a oxidação do acetilmetilcarbinol é peculiar somente à alguns microorganismos fermentadores do ácido cítrico, tais como o *Streptococcus citrovorus*, o *Streptococcus paracitrovorus* e outros.

Inúmeros são os microorganismos causadores de diferentes formas de deterioração e decomposição da manteiga. No que diz respeito às alterações dos caracteres organoléticos da manteiga, muito importante é a presença das bactérias do genero *Pseudomonas*.

(*) Trabalho apresentado e aprovado pela 1.ª Jornada Brasileira de Bromatologia.

Jamieson¹ adicionou às manteigas, culturas puras e mistas de diferentes microorganismos do genero *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. achromobacter*, *P. mucidolens*, *P. putrefaciens*) tendo obtido como resultado diferentes alterações nos caracteres organoléticos. O “gôsto de peixe” têm como causa principal a presença de leveduras *Oidium lactis* enquanto que o “gôsto de levedura” e o cheiro adocicado de algumas manteigas é devido, principalmente, às leveduras do gênero *Torula*. As bactérias esporuladas aeróbias (*Bacillus*), sobretudo as do grupo do *Bacillus subtilis* são as responsáveis pelo “gôsto metálico” em virtude da decomposição da caseína por elas operada. Outros microorganismos do gênero *Bacillus* são causadores do gôsto ácido de algumas manteigas. Germens banais e muito comuns na manteiga podem clivar a molécula gordurosa por meio de uma enzima (esteatopsina) produzindo como consequencia a “rancidão” da manteiga.

A presença das bactérias do grupo coliforme em elevado teor é considerada como de grande importância higiênica, sabido que o número excessivo de coliformes pode eventualmente indicar a coexistência de espécies patogênicas, tais como os agentes causais da febre tifóide, das disenterias, etc. Entretanto, é necessário acentuar que mesmo as manteigas com teores grandes de coliformes podem deixar de conter germens do grupo tifo-disentérico, assim como quaisquer outros patogênicos.

A contaminação pelos coliformes, conforme o demonstram diversos trabalhos, entre outros o de Vasileff², pode se originar por meio da poluição pelas poeiras do solo e forragens, pela má limpeza do vasilhame, pelos excrementos tanto humanos como animais e pelo emprêgo de águas de lavagens contaminadas. Compreende-se pois, a importância sanitária da caracterização dos coliformes como índice de preparo inadequado das manteigas. Do ponto de vista sanitário, as elevadas contagens de coliformes nas manteigas indicam sujidades diretas ou indiretamente acarretadas durante o manuseio.

Do ponto de vista tão discutido da ação patogênica dos coliformes, importa acentuar, consoante as observações de Sherman e Wing³, a produção de vários sub-produtos desses germes e, principalmente, a elaboração de toxinas enterotrópicas e neurotrópicas, muito bem estudadas por Vincent⁴. Tais toxinas, de acôrdo com verificações conduzidas por Pacheco e Xavier¹⁵, atuam fortemente sobre o intestino isolado e sobre a curva de pêso e consoante as observações de Mello e Rogick¹⁴ podem determinar a morte de

animais de experiência, em doses mínimas. Nessas condições, a inocuidade dos coliformes é perfeitamente discutível e a sua presença em alimentos deve ser considerada, sob o ponto de vista higiênico, imprópria, mercê de suas propriedades comprovadamente toxigênicas.

MÉTODO

No presente trabalho são analisados os resultados de exames microbiológicos procedidos em 366 manteigas e realizados na secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz.

O método empregado foi o seguinte: Tomam-se 11 cm³ de manteiga previamente fundida à temperatura conveniente e adicionam-se 90 cm³ de água filtrada estéril. Preparam-se a seguir as diluições sucessivas de 1/100, 1/1.000, 1/10.000 e 1/100.000, em água filtrada estéril semeando 1 cm³ de cada diluição em tubos contendo meio de verde brilhante; 1 cm da amostra de manteiga pura fundida e diluída em água estéril filtrada, é semeado em um tubo com meio de Sabouraud e outro de ágar comum, observando-se nos dias sucessivos o desenvolvimento de coliformes e cogumelos os quais serão isolados e identificados. A contagem é realizada da seguinte forma: preparam-se 6 placas de Petri estéreis; colocando-se nas três primeiras, 1 cm³ da diluição 1/10.000 e nas três últimas, 1 cm³ da diluição 1/100.000 tendo fundido previamente 2 tubos de meio de Garrod, 2 de ácido rosólico e 2 de ágar standard, coloca-se o conteúdo dos tubos sobre as duas diferentes diluições contidas nas placas de Petri.

Deixa-se solidificar e incuba-se a 37°C por 3 dias. No caso de serem as placas contáveis, realiza-se a primeira contagem após os 3 dias permanecendo depois as placas por mais dois dias em estufa a 37°C, realizando-se após 5 dias da sementeira, a segunda contagem. Registram-se os dois resultados obtidos.

As placas não sendo contáveis após os 3 primeiros dias de incubação são abandonadas.

RESULTADOS

O quadro abaixo transcrito exprime o total dos resultados. Na coluna 3 o número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento exclusivo de bactérias; na coluna 4 estão registrados o

número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento concomitante de bactérias e leveduras; na coluna 5, o número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento de bactérias e bolores; na coluna 6, o número e percentagem de amostras em que houve desenvolvimento de bactérias, leveduras e bolores; na coluna 7, o número e percentagem das amostras em que houve desenvolvimento de germes do grupo coliforme; na coluna 8, o número e natureza dos diferentes cogumelos.

Natureza do produto	Número de amostras		Bactérias		Bactérias + leveduras		Bactérias + bolores		Bactérias + cogumelos (leveduras e bolores)		Grupo coliforme		Cogumelos	
			N.	%	N.	%	N.	%	N.	%			leveduras	bolores
Manteiga	366	19	5,3%	327	89,3%	20	5,4%	347	94,7%	167	45,6%	327	20	

Para a contagem global de microorganismos, foram os seguintes os dados obtidos:

de 0 a 500 mil	germes por grama	— 35 amostras
de 500 mil a 1 milhão	germes por grama	— 25 amostras
de 1 milhão a 10 milhões	germes por grama	— 90 amostras
de 10 milhões a 20 milhões	germes por grama	— 55 amostras
de 20 milhões a 30 milhões	germes por grama	— 45 amostras
Acima de 30 milhões	germes por grama	— 116 amostras

366

DISCUSSÃO

Os microorganismos contaminantes estavam assim distribuídos: 347 amostras (94,7%) apresentaram desenvolvimento concomitante de bactérias (habitualmente bacilos *Gram*-positivos, esporulados, aeróbios ou bastonetes *Gram*-negativos), leveduras e bolores diversos; enquanto que nas restantes 19 amostras (5,3%) houve desenvolvimento exclusivo de bactérias e em 327 (89,3%) houve desenvolvimento de bactérias e leveduras.

No que diz respeito aos germes do grupo coliforme, as análises por nós efetuadas, atestam a sua presença em 45,6% das manteigas examinadas. A percentagem de coliformes indica seguramente as condições insatisfatórias e precárias em tôdas as fases do preparo

das manteigas, a saber: contaminação do leite na ordenha por parte do ordenhador ou de recipientes sem as necessárias condições de limpeza; ulteriormente, contaminação do creme, e finalmente contaminação da manteiga.

Além da contaminação pelos coliformes durante tôdas as fases de manuseio do produto, contaminações pelos germes mais diversos são super-ajuntadas de maneira a condicionarem os elevados teores de microorganismos encontrados. Todavia, de tôdas as formas de contaminação, a mais lastimável é a presença da *E. coli*, desde que se admite que o bacilo coli é um indício positivo de contaminação fecal por fezes de origem humana ou animal. No total das amostras examinadas a *E. coli* esteve presente 92 vêzes ou seja em 25,1%.

A *E. freundii* foi encontrada em 17 amostras (3,2%) e de acôrdo com o critério estabelecido por Parr⁵, em 1938, os intermediários do grupo coliforme constituem também um índice de contaminação fecal.

Dentre os outros germes do grupo coliforme encontramos o *Aerobacter aerogenes* em 57 das amostras, ou seja em 15,5%. Pôsto que os microorganismos do gênero *Aerobacter* não constituam um indício na apreciação dos índices sanitários e de controle bacteriológico, podem contudo produzir alterações nos caracteres organoléuticos das manteigas salgadas ou não, conforme verificaram Hammer e Yale⁶.

O *Aerobacter cloacae* foi encontrado em 15 amostras ou seja em 4% do total das examinadas. Conquanto tidos habitualmente como inócuas as bactérias do grupo *cloacae-aerogenes* foram responsabilizadas por casos de intoxicação alimentar por Gilbert, Coleman e Laviano⁷. Em publicação anterior Rogick¹⁰ havia verificado a flora colibacilar das manteigas expostas ao consumo no mercado de São Paulo e os resultados obtidos foram superiores aos nossos no que respeita à presença de *E. coli* para o qual obteve 69,35% de positividade. Em relação ao grupo *Aerobacter* os seus resultados foram concordantes com os nossos (20,97% para Rogick e 19,5% para nós); sendo superior a percentagem obtida para os intermediários do grupo coliforme encontrados em 9,68% das amostras examinadas por aquele autor.

Ainda Rogick¹⁰ acentúa a ausência dos germes do grupo *Escherichia-Aerobacter* nas manteigas salgadas, atribuindo ao cloreto de sódio (2,5% a 3%) essa ação inibitória. Com relação a outros

germes patogênicos, particularmente o *Mycobacterium tuberculosis* julgamos dispensável a sua pesquisa sistemática pois, embora Mello e Mastrofrancisco⁸ houvessem, em 1938, demonstrado a presença do *M. tuberculosis* em 33% dos leites da Capital de São Paulo. Mello⁹ não conseguiu evidenciar um só caso positivo para o bacilo de Koch nas manteigas por êle examinadas e consumidas em São Paulo. Tal diferença se explica de acôrdo com o mesmo autor em virtude da baixa incidência do bacilo da tuberculose no rebanho leiteiro do interior do Estado (cêrca de 2%), além da baixa vitalidade do bacilo, que morre habitualmente em 3 semanas, em consequência da inadaptabilidade ao meio acidificado.

A presença de leveduras e de bolores nas manteigas por nós examinadas foi muito elevada, ocorrendo tais cogumelos em 90,5% do total das amostras. Dentre as mais frequentes leveduras identificadas, encontramos as do gênero *Saccharomyces* em 129 amostras, as do gênero *Candida* em 44 amostras, as do gênero *Geotrichum* em 46 amostras; 19 amostras demonstraram leveduras do gênero *Torulopsis* e em 3 ocorreu a presença de *Rhodotorula*, leveduras produtoras de pigmento vermelho. Bolores pertencentes ao gênero *Penicillium* ocorreram em 9 das manteigas examinadas.

Conforme já foi assinalado em publicação anterior por Souto, Godoy e Menezes Jr¹¹, a presença de tais cogumelos em quantidade excessiva indica necessariamente deficiência na manufatura do produto ou emprêgo de métodos inadequados de refrigeração para conservação dos mesmos. Os cogumelos produzem, ademais, alteração nos caracteres organoléticos e diminuição do poder nutritivo pela degradação das gorduras e das proteínas. Consoante as afirmações de Macy e Richie¹² as leveduras e outros cogumelos servem de valioso critério para a avaliação do estado de conservação da manteiga, da eficiência da pasteurização e do estado sanitário das cremeiras.

CONCLUSÕES E RESUMO

1.º) Foram examinadas 366 amostras de manteigas de proveniência diversa.

2.º) A percentagem total de germes do grupo coliforme foi de 45,6% no total das manteigas examinadas.

3.º) A *Escherichia coli* foi encontrada em 92 amostras examinadas ou seja em 25,1%; a *Escherichia freundii* foi encontrada em 12 amostras ou seja em 3,2%; o *A. aerogenes* foi verificado em 57

amostras ou em 15,5%; o *A. cloacae* foi identificado em 15 amostras ou seja em 4%.

4.º) Em 250 amostras a contagem da flora global foi inferior a 30 milhões de germes por grama e em 116 amostras superior a 30 milhões de germes por grama.

CONCLUSIONS AND SUMMARY

1st. — 366 samples of butters from different places were examined.

2ed. — The total percentage of germe in the coliform group was 45.6% in all the butters examined.

3rd. — *Escherichia coli* was found in 92 samples, 25,1%; *Escherichia freundii* in 12 samples, 3,2%; *A. aerogenes* in 57 samples, 15,5%, and *A. cloacae* was identified in 15 samples, 4%.

4th. — In 250 samples the total flora count was less than 30 million germs per gramme, and in 116 samples it was more than 30 million germs per gramme.

AGRADECIMENTO

Os autôres agradecem às sras, Olga Pupo, Aparecida Moreno Pássaro, srts. Ema de Lima, Zélia Pujol Gambier, Aparecida Marcondes, Aparecida Carvalhaes, Ymê Amato e Sr. Clovis Napoleão, pelo eficiente auxílio prestado no desempenho da parte técnica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — JAMIESON, M. C. — 1943 — A new method for studying the effect of bacteria on butter flavor — *Food Research*, Jan. Feb., 8: 62.
- 2 — VASILEFF, I. — 1932 — Recherche et numeration du coli-bacille dans le lait par la methode du rouge neutre — *Le lait*, 12: 318.
- 3 — SHERMAN, J. M. e WING, V. H. — 1933 — The significance of colon bacteria in milk with special reference to standard — *Journ. Dairy Sc.*, 16: 165.
- 4 — VINCENT, H. — 1925 — Sur l'elimination urinaire du Bacille coli-comunis et sur son origine hématogene. *C. Rend. Soc. Biol.*, 180: 239.
- VINCENT, H. — 1925 — Sur la pluralité des toxines du Bacillus coli et les bases experimentalles de la serumtherapie anticoli bacillaire. *Comp. Rend. Acad. Sc.*, 180: 1624.

- VINCENT, H. — 1928 — Indice toxiques des races du *Bacillus coli*. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 187: 787.
- 5 — FARR, L. W. — 1939 — Coliform bacteria. *Bacteriological Reviews*, 3: 1.
- 6 — HAMMER e YALE — 1932 — *Journ. Dairy Sc.*, 15: 199.
- 7 — GILBERT, R., COLEMAN, M. B. e LAVIANO, A. B. — 1932 — Food poisoning due to toxic substances formed by strains of the cloacae aerogenes group. *Amer. Journ. Publ. Health*, 22: 721.
- 8 — MELLO, A. e MASTROFRANCISCO, N. — 1938 — Verificação sôbre a presença do bacilo tuberculoso no leite da Capital. *Bol. Ind. Animal*, 1: 25.
- 9 — MELLO, A. — 1939 — Sôbre a presença do bacilo tuberculoso nas manteigas de consumo na Capital. *Bol. Ind. Animal*, 2: 29.
- 10 — ROGICK, F. A. — 1942 — A manteiga e a sua flora colibacilar. *Rev. Ind. Animal*, 5: 35.
- 11 — SOUTO, A. Büller, GODÓI, O. e MENEZES JR., J. B. — 1946 — Investigações microscópicas sôbre a manteiga (Trabalho apresentado à 1.^a Jornada Brasileira de Bromatologia).
- 12 — MACY, H. e RICHIE, H. B. — 1929 — The mold and yeast count as an index of keeping quality of butter. *Jour. Dairy Sc.*, 12: 351.
- 13 — PACHECO, Genésio e XAVIER, Antônio Augusto — 1938 — Pesquisas sôbre os efeitos dos filtrados de culturas antigas de bacilo coli administrados por via digestiva a coelhos. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, 35:
- 14 — MELLO, A. e ROGICK, F. A. — 1940 — A flora colibacilar do queijo tipo Minas e toxi-infecção alimentar. *Rev. Ind. Animal*, 3: 35.
- 15 — PACHECO, Genésio e XAVIER, Antônio Augusto — 1938 — Influência do leite puro ou fermentado sôbre a curva de pêso. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, 33.