

ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DE  
GERMES DO LEITE EM PLACAS DE AGAR  
"STANDARD" E AGAR-LEITE-TRIPTONA-GLI-  
COSADO, E INCUBADAS ÀS TEMPERATURAS  
DE 32 e 37°C. (\*)

BRUNO RANGEL PESTANA

Chefe da Sub-divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz

EMMA DE LIMA

Técnica de laboratório do Instituto Adolfo Lutz

O leite, sendo um alimento completo e, como tal, insubstituível em todas as fases da vida humana, deve merecer da parte dos sanitaristas grande atenção.

O exame bacteriológico é uma das principais, ou talvez a principal prova a que deve ser submetido o leite, afim de ser verificado o seu grau de pureza.

No exame bacteriológico, uma das partes principais tem sido a contagem do número de germes encontrados no leite, pois a maior ou menor quantidade deles poderá orientar sobre a qualidade do produto.

Essa questão é objeto de estudos muito cuidadosos.

Como é do conhecimento dos que se dedicam a esses estudos, a composição do meio de cultura e a temperatura de incubação são os dois fatores essenciais no exame bacteriológico do leite.

O presente trabalho visa demonstrar as vantagens do emprego de placas com agar-leite-triptona-glicosado na contagem de germes, e de temperatura mais adequada ao crescimento dos germes habituais constantes da flora láctea.

Esse estudo foi dividido em duas partes:

- 1º) Procurámos verificar o crescimento dos germes sob a *influência do meio (agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado)* incubado em temperaturas diferentes, 32 e 37°C.;

---

(\*) Recebido para publicação em 12-3-42.

- 2º) Verificámos o crescimento dos germes sob a *influência da temperatura*, isto é, incubados a 32 e 37°C., em ambos os meios.

Estas observações foram conduzidas durante 5 meses. Relatamos aqui os primeiros resultados obtidos.

#### INFLUÊNCIA DO MEIO

Até 20 de Fevereiro de 1941, o meio de cultura empregado na secção de "Controles Biológicos", do Instituto Adolfo Lutz, para a contagem, em placas, do número de germes, era o agar "standard" <sup>1</sup>, meio esse adotado oficialmente e cuja fórmula é a seguinte:

Adicionar 3 gramas de extrato de carne, 5 gramas de peptona e 15 gramas de agar a 1.000 cc. de água destilada. Ferver até que todo o agar esteja dissolvido. Completar o volume perdido com água destilada. Ajustar a reação de tal modo que a leitura do pH depois da esterilização esteja entre 6,4 — 7,0.

Levar à temperatura de ebulição, agitando frequentemente, completar o volume perdido com água destilada e clarificar.

Distribuir em recipientes apropriados e esterilizar.

A substituição desse meio, porém, já vem sendo estudada desde algum tempo por diversos autores.

Como foi verificado, existem no leite certos germes que se desenvolvem muito pobremente no agar "standard" e produzem colônias de dimensões tão pequenas que se torna quasi impossível a sua contagem. No leite cru, essas colônias são dadas como pertencentes ao estreptococo. No leite pasteurizado, elas tanto podem pertencer ao estreptococo, que resiste à temperatura da pasteurização, como a germes esporulados, termófilos, facultativos ou obrigatórios.

Por outro lado, há também germes que não apresentam crescimento visível no agar "standard", mas que se acham em estado latente nas amostras de leite examinadas. Nessas condições, há grandes causas de erro na contagem dos germes das placas semeadas.

Safford e Stark <sup>2</sup> demonstraram que a adição de leite desnatado ao agar "standard" aumenta o número de colônias da amostra de leite nele inoculado. Essa investigação veio confirmar o trabalho de Hiscox, Hoy, Lomax, Mattick e outros. Esse aumento chega a 17%. A adição de glicose ao mesmo meio eleva esse aumento a 35%.

Em 1935, Breed <sup>3</sup>, estudando esse assunto, menciona 2 fórmulas de agar para a substituição do agar "standard":

- 1º) Agar-leite-triptona-glicosado;
- 2º) Modificação inglesa do agar "standard". Ambas as fórmulas contêm leite crú.

Yale e Pederson <sup>4</sup>, em 1936, procederam a uma série de exames de leite, tanto pasteurizado como crú, estudando-os sob o ponto de vista da temperatura de incubação e do meio de cultura utilizado.

Os meios empregados foram o agar "standard" e o agar-leite-triptona-glicosado, e as temperaturas variavam de 18 a 55°C.. Os autores obtiveram resultado mais favorável com o agar leite à temperatura de 32°C., ou pouco menos, sobre o agar "standard" nas mesmas condições.

No mesmo ano, Bowers e Hucker <sup>5</sup> publicaram minucioso trabalho sobre o mesmo assunto, estudando também a neopeptona em lugar da triptona. Esse estudo veio confirmar os seguintes pontos de seu trabalho ulterior:

- 1º) que o agar-triptona-glicosado é mais eficiente do que o agar "standard", para o exame bacteriológico do leite;
- 2º) que a adição de leite desnatado, a esse meio, aumenta o número de colônias; e, finalmente,
- 3º) que a triptona é 37% mais eficiente do que a neopeptona.

Yale <sup>6</sup>, em 1938, apresentou em trabalho muito bem desenvolvido o resultado de 42 investigações feitas por 56 laboratórios, sobre 24.000 amostras de leite crú, pasteurizado, feitas comparativamente em agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado, às temperaturas de 32 e 37°C., terminando com as conclusões seguintes:

"No meio contendo triptona, as colônias são maiores do que no agar "standard", sendo assim contadas com mais facilidade, tanto por esse motivo como pela opacidade do meio".

Em 1939, Abele <sup>7</sup>, justificando a modificação do meio de cultura empregado pelo "Standard Methods for the Examination of Dairy products", apresenta substancial trabalho em que faz um estudo comparativo entre o agar-leite-triptona-glicosado (que designa por agar-T-G-E-M), o agar-peptona-dextrosado (agar-A-A-M-M-C) e o agar "standard" incubados a 32 e 37°C.. Estudou 335 amostras de leite e cremes (crús e pasteurizados).

Demonstra o autor a eficiência do T-G-E-M sobre os outros meios e a vantagem da incubação a 32°C..

## TÉCNICA

*Meios empregados* — No presente trabalho empregámos o agar “standard”<sup>1</sup>, já mencionado, e o agar-leite-triptona-glicosado, cuja fórmula é a seguinte<sup>8</sup>:

Agar .....	1,5%
Extrato de carne .....	0,3%
Triptona .....	0,5%
Glicose .....	0,1%
Água destilada	
pH preferível: 7,0. Antes da esterilização final adiciona-se 1% de leite desnatado.	

*Amostras semeadas* — Semeámos 398 amostras de leite pasteurizado, algumas entradas diretamente para exame bacteriológico e a maior parte para exame químico.

*Contagem das placas* — Para apresentação dos resultados, separámos as placas em 8 grupos:

- 1º) placas contáveis;
- 2º) placas incontáveis;
- 3º) placas contáveis em agar “standard”;
- 4º) placas contáveis em agar-leite-triptona-glicosado;
- 5º) placas contáveis a 32°C.;
- 6º) placas contáveis a 37°C.;
- 7º) placas contáveis em ambos os meios, e, finalmente,
- 8º) placas contáveis em ambas as temperaturas.

*Diluições* — Com as primeiras 79 amostras, empregámos diluições diferentes, a começar pela de 1/100 (sendo que essa diluição era utilizada apenas para as amostras de leite de granja).

Da 80.<sup>a</sup> amostra por diante, fixamos a diluição de 1/10.000 para as sementeiras, por havermos verificado ser essa diluição a mais constante. As diluições eram feitas com água filtrada esterilizada, empregando-se uma pipeta para cada diluição.

*Temperatura* — Até a 79.<sup>a</sup> amostra empregámos apenas a temperatura de 37º; daí por diante utilizámos as temperaturas de 37 e 32°C., comparativamente.

*Tempo de incubação* — A contagem era feita após 48 horas de incubação.

*Resultado* — Conforme se poderá verificar no quadro que se segue, a diferença na contagem do número de germes, nos 2 meios, já se faz notar a 37°C. e essa diferença se acentua ainda mais, quando estudamos comparativamente os 2 meios diferentes, incubados à temperatura de 32°C..

QUADRO I

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.
30	20-2-41	1/100.000	8.400.000	9.800.000
31	"	"	6.200.000	9.600.000
32	21-2-41	"	5.600.000	8.000.000
33	28-2-41	"	300.000	5.400.000
35	"	"	300.000	3.200.000
36	"	"	300.000	6.000.000
47	31-3-41	"	Incontavel	Incontavel
48	"	"	25.000.000	20.000.000
38	3-3-41	1/1.000	160.000	Incontavel
39	"	"	45.000	160.000
41	10-3-41	"	280.000	Incontavel
44	20-3-41	"	140.000	Incontavel
45	22-3-41	"	80.000	112.000
51	31-3-41	1/100	200	600
33	28-2-41	1/10.000	1.370.000	Incontavel
34	"	"	2.150.000	2.360.000
35	"	"	320.000	Incontavel
36	"	"	680.000	Incontavel
37	3-3-41	"	300.000	600.000
40	5-3-41	"	2.020.000	1.950.000
42	10-3-41	"	780.000	340.000
43	20-3-41	"	400.000	1.800.000
11	22-3-41	"	320.000	380.000
12	"	"	420.000	920.000
13	"	"	120.000	920.000
14	"	"	500.000	190.000
15	"	"	60.000	2.100.000
16	"	"	60.000	120.000
1	21-3-41	"	210.000	280.000
2	"	"	1.980.000	1.340.000
3	"	"	560.000	640.000
4	"	"	2.320.000	2.460.000
5	"	"	320.000	840.000
6	"	"	300.000	980.000

CONTAGEM DE GERMES DO LEITE

23

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.
7	21-3-41	1/10.000	60.000	900.000
8	"	"	Incontavel	Incontavel
9	"	"	150.000	540.000
10	"	"	Incontavel	Incontavel
46	22-3-41	"	140.000	150.000
17	24-3-41	"	Incontavel	Incontavel
18	"	"	300.000	700.000
19	"	"	10.000	340.000
20	"	"	500.000	490.000
21	"	"	210.000	230.000
22	"	"	Incontavel	Incontavel
23	26-3-41	"	150.000	940.000
24	"	"	2.500.000	Incontavel
25	"	"	90.000	540.000
26	"	"	150.000	380.000
27	"	"	580.000	580.000
28	"	"	380.000	Incontavel
29	27-3-41	"	30.000	40.000
30	"	"	200.000	440.000
31	"	"	450.000	580.000
32	"	"	80.000	140.000
33	"	"	30.000	10.000
34	"	"	140.000	120.000
35	28-3-41	"	Incontavel	Incontavel
36	"	"	700.000	900.000
37	"	"	440.000	500.000
38	"	"	Incontavel	Incontavel
39	"	"	2.200.000	2.900.000
40	"	"	800.000	1.000.000
41	29-3-41	"	2.600.000	2.750.000
42	"	"	170.000	30.000
43	"	"	Incontavel	Incontavel
44	"	"	460.000	340.000
45	"	"	Incontavel	Incontavel
46	"	"	Incontavel	Incontavel
49	31-3-41	"	1.500.000	1.450.000
50	"	"	50.000	500.000
52	"	"	1.500.000	1.400.000
53	2-4-41	"	Incontavel	Incontavel
54	"	"	300.000	800.000
55	"	"	Incontavel	Incontavel
56	"	"	80.000	120.000
57	"	"	Incontavel	Incontavel
58	"	"	60.000	80.000

*Influência da temperatura* — O método de contagem em placas, para o exame bacteriológico do leite, sendo um trabalho de rotina, exige estufas de grande capacidade e que mantenham uma temperatura uniforme e constante.

Conforme fizemos notar no início deste trabalho, a influência da temperatura foi o segundo ponto visado pelas nossas observações.

A temperatura que adotávamos para a incubação das placas semeadas no nosso serviço, de acordo com o método "standard", era a de 37°C..

A substituição dessa temperatura de incubação também vem sendo estudada por diversos autores, e alguns a estudaram juntamente com a substituição do meio de cultura.

Breed e Pederson<sup>9</sup>, de 1930-1931, submetem à prova as estufas comuns usadas para incubação.

Yale, Pederson e Breed<sup>10</sup>, estudando a uniformidade de temperatura exigida para o exame bacteriológico do leite, concluíram que:

"A variação da temperatura das estufas é uma das principais causas de erro na contagem de placas, procedida no trabalho rotineiro do "controle" de leite, pelo fato de estar a temperatura de 37°C. no limite máximo da temperatura de crescimento dos vários tipos de germes encontrados no leite".

Em 1934, Pederson e Yale<sup>11</sup>, após experiências feitas com 78 amostras de leite, incubadas em temperaturas que variavam de 21 a 55°C., por 48 horas de incubação, chegaram às seguintes conclusões:

- 1º) A temperatura de 32°C. deve ser preferida à de 37°C. para a incubação das placas destinadas à contagem dos germes do leite;
- 2º) Com 48 horas de incubação a 32°C. obtem-se maior número de colônias do que a 37°C., resultando uma avaliação melhor da qualidade do leite;
- 3º) A 32°C. há menos erro na contagem do que a 37°C., devido à variação de temperatura da estufa;
- 4º) A porcentagem da contagem máxima, obtida em 48 horas, varia consideravelmente a 37°C., porém é perfeitamente constante a 32°C.

Ao experimentarmos o novo meio de cultura, adotamos sistematicamente a semeadura das placas em duplicata. Incubávamos uma série a 37°C. e outra a 32°C..

O resultado foi francamente satisfatório, quando empregamos a temperatura de 32°C., apresentando um crescimento mais favorável, conforme se pode ver nos quadros seguintes:

QUADRO II

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
110	18-4-41	1/10.000	400.000	900.000	3.000.000	Incontavel
111	"	"	240.000	300.000	1.000.000	1.300.000
115	"	"	470.000	740.000	1.200.000	1.700.000
119	"	"	1.040.000	1.270.000	2.870.000	Incontavel
120	"	"	300.000	1.050.000	Incontavel	Incontavel
121	19-4-41	"	1.380.000	1.640.000	Incontavel	Incontavel
123	25-4-41	"	200.000	300.000	950.000	1.940.000
124	"	"	600.000	700.000	1.050.000	1.560.000
129	26-4-41	"	320.000	830.000	30.000	400.000
131	"	"	2.160.000	2.180.000	1.150.000	2.600.000
132	"	"	270.000	410.000	350.000	700.000
135	"	"	1.600.000	2.250.000	2.000.000	2.500.000
140	28-4-41	"	2.500.000	2.860.000	2.200.000	Incontavel
142	"	"	1.800.000	1.900.000	3.300.000	Incontavel
143	"	"	1.440.000	2.020.000	1.900.000	2.700.000
152	30-4-41	"	480.000	630.000	910.000	960.000
153	"	"	290.000	520.000	690.000	1.180.000
154	"	"	30.000	70.000	140.000	240.000
155	"	"	240.000	490.000	540.000	780.000
157	"	"	1.120.000	1.350.000	2.250.000	2.400.000
158	"	"	300.000	430.000	870.000	920.000
159	"	"	40.000	110.000	320.000	500.000
160	"	"	1.030.000	750.000	1.990.000	2.030.000
161	"	"	570.000	680.000	1.230.000	1.770.000
162	"	"	10.000	110.000	90.000	170.000
166	1-5-41	"	130.000	360.000	1.610.000	2.030.000
169	"	"	70.000	290.000	1.170.000	2.170.000
171	"	"	2.050.000	2.600.000	Incontavel	Incontavel
53	"	"	80.000	180.000	250.000	260.000
54	"	"	580.000	830.000	1.120.000	1.150.000
179	2-5-41	"	580.000	1.180.000	800.000	1.080.000
180	"	"	610.000	1.480.000	940.000	1.850.000
181	"	"	2.510.000	2.720.000	2.620.000	Incontavel
183	"	"	80.000	140.000	110.000	150.000
184	"	"	620.000	1.190.000	680.000	1.070.000
188	7-5-41	"	—	1.450.000	80.000	Incontavel



N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.
59	3-4-41	1/10.000	50.000	460.000
60	"	"	120.000	560.000
61	"	"	280.000	800.000
62	"	"	80.000	220.000
63	"	"	80.000	800.000
64	"	"	40.000	60.000
66	4-4-41	"	280.000	340.000
67	"	"	2.900.000	3.000.000
68	"	"	2.800.000	2.600.000
69	"	"	200.000	460.000
70	"	"	420.000	360.000
71	"	"	Incontavel	Incontavel
72	5-4-41	"	60.000	430.000
73	"	"	300.000	780.000
74	"	"	320.000	400.000
75	"	"	140.000	540.000
76	"	"	200.000	140.000
77	"	"	360.000	600.000
48	"	"	300.000	800.000
78	7-4-41	"	2.700.000	2.600.000
79	"	"	300.000	300.000
80	"	"	Incontavel	Incontavel
81	"	"	Incontavel	Incontavel
83	"	"	1.500.000	1.800.000
84	9-4-41	"	30.000	60.000
85	"	"	400.000	1.200.000
86	"	"	2.300.000	2.600.000
88	"	"	2.800.000	3.000.000
92	15-4-41	"	2.990.000	3.180.000
94	"	"	460.000	500.000
95	"	"	2.540.000	2.580.000
96	"	"	Incontavel	Incontavel
97	16-4-41	"	220.000	670.000
98	"	"	480.000	840.000
100	"	"	580.000	630.000
101	"	"	Incontavel	Incontavel
103	17-4-41	"	Incontavel	Incontavel
104	"	"	Incontavel	Incontavel
105	"	"	Incontavel	Incontavel
106	"	"	90.000	220.000
107	"	"	Incontavel	Incontavel
108	"	"	310.000	440.000
109	"	"	50.000	50.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes	germes por cc.	n.º de germes
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
189	7-5-41	1/10.000	160.000	1.100.000	480.000	1.860.000
190	"	"	80.000	470.000	300.000	1.200.000
191	"	"	950.000	1.700.000	Incontavel	Incontavel
192	"	"	30.000	1.800.000	480.000	1.200.000
193	"	"	700.000	1.400.000	1.200.000	Incontavel
194	"	"	120.000	1.320.000	580.000	Incontavel
198	8-5-41	"	1.270.000	1.580.000	1.940.000	2.240.000
201	"	"	270.000	900.000	400.000	880.000
202	"	"	670.000	1.480.000	Incontavel	Incontavel
203	"	"	1.630.000	1.800.000	1.700.000	2.200.000
204	"	"	2.220.000	2.540.000	2.200.000	3.000.000
206	"	"	1.320.000	2.090.000	Incontavel	Incontavel
208	"	"	2.840.000	3.300.000	Incontavel	Incontavel
56	"	"	130.000	293.000	240.000	580.000
209	9-5-41	"	1.500.000	1.700.000	Incontavel	Incontavel
210	"	"	800.000	650.000	700.000	1.200.000
211	"	"	300.000	550.000	600.000	800.000
213	"	"	60.000	600.000	300.000	720.000
215	"	"	350.000	120.000	200.000	400.000
217	"	"	140.000	400.000	300.000	600.000
219	"	"	130.000	620.000	80.000	380.000
220	"	"	110.000	980.000	120.000	980.000
222	14-5-41	"	60.000	280.000	Incontavel	Incontavel
225	"	"	340.000	2.900.000	640.000	700.000
227	"	"	720.000	1.290.000	Incontavel	Incontavel
228	14-5-41	"	2.890.000	Incontavel	Incontavel	Incontavel
229	"	"	1.200.000	1.800.000	Incontavel	Incontavel
60	"	"	320.000	500.000	Incontavel	Incontavel
230	16-5-41	"	120.000	400.000	100.000	420.000
231	"	"	800.000	900.000	1.370.000	1.580.000
232	"	"	1.600.000	2.000.000	1.450.000	2.100.000
237	"	"	400.000	500.000	1.200.000	1.280.000
240	"	"	1.800.000	1.600.000	2.100.000	3.000.000
61	"	"	100.000	110.000	60.000	150.000
243	17-5-41	"	70.000	120.000	70.000	250.000
244	"	"	260.000	120.000	300.000	750.000
246	"	"	850.000	800.000	350.000	980.000
249	"	"	80.000	100.000	100.000	300.000
250	"	"	340.000	350.000	610.000	880.000
251	"	"	550.000	500.000	1.080.000	1.200.000
252	"	"	1.200.000	1.550.000	2.250.000	3.000.000
253	"	"	550.000	570.000	90.000	1.200.000
254	18-5-41	"	1.650.000	1.700.000	2.200.000	2.580.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes por cc.	germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
256	18-6-41	1/10.000	600.000	570.000	20.000	700.000
257	"	"	500.000	540.000	800.000	1.000.000
258	"	"	1.500.000	2.000.000	2.300.000	3.000.000
259	"	"	50.000	20.000	700.000	2.250.000
260	"	"	70.000	120.000	300.000	980.000
262	"	"	1.200.000	1.500.000	1.880.000	2.800.000
63	21-5-41	"	30.000	45.000	220.000	250.000
268	"	"	1.650.000	2.850.000	Incontavel	Incontavel
271	"	"	60.000	180.000	220.000	350.000
273	"	"	450.000	1.800.000	1.200.000	3.000.000
276	22-5-41	"	180.000	200.000	270.000	800.000
278	"	"	1.200.000	1.400.000	1.400.000	1.600.000
279	"	"	280.000	320.000	400.000	400.000
280	"	"	180.000	180.000	350.000	450.000
281	"	"	1.300.000	1.310.000	1.600.000	1.700.000
282	"	"	400.000	600.000	1.530.000	1.850.000
284	"	"	870.000	950.000	Incontavel	Incontavel
64	"	"	250.000	300.000	90.000	790.000

## QUADRO III

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes por cc.	germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
285	23-5-41	1/10.000	260.000	280.000	200.000	310.000
286	"	"	120.000	100.000	180.000	350.000
288	"	"	20.000	80.000	210.000	300.000
289	"	"	100.000	80.000	100.000	270.000
290	"	"	100.000	250.000	400.000	570.000
292	"	"	170.000	380.000	440.000	500.000
249	"	"	100.000	270.000	290.000	340.000
295	"	"	20.000	10.000	30.000	100.000
296	"	"	150.000	360.000	200.000	350.000
297	24-5-41	"	80.000	150.000	150.000	850.000
304	"	"	490.000	1.070.000	200.000	1.200.000
306	"	"	320.000	480.000	360.000	850.000
308	"	"	180.000	290.000	650.000	1.060.000
311	26-5-41	"	300.000	370.000	320.000	400.000
316	"	"	150.000	200.000	160.000	200.000
318	"	"	150.000	340.000	400.000	850.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de	Agar - leite	Agar "standard" n.º de	Agar - leite
			germes por cc.	n.º de germes por cc.	germes por cc.	n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
320	26-5-41	1/10.000	320.000	350.000	400.000	550.000
322	27-5-41	"	100.000	130.000	100.000	190.000
324	"	"	330.000	440.000	630.000	910.000
325	"	"	600.000	850.000	960.000	1.090.000
327	27-5-41	"	240.000	300.000	370.000	470.000
328	"	"	140.000	170.000	170.000	200.000
329	"	"	190.000	400.000	280.000	430.000
331	"	"	320.000	500.000	350.000	800.000
332	28-5-41	"	100.000	150.000	160.000	190.000
334	"	"	230.000	300.000	290.000	300.000
336	"	"	100.000	150.000	110.000	300.000
337	"	"	560.000	1.000.000	910.000	1.110.000
338	"	"	60.000	160.000	120.000	160.000
340	"	"	180.000	230.000	200.000	250.000
341	"	"	110.000	280.000	230.000	350.000
342	"	"	450.000	520.000	380.000	750.000
69	"	"	300.000	400.000	540.000	750.000
344	29-5-41	"	250.000	300.000	200.000	400.000
346	"	"	1.000.000	1.750.000	3.000.000	3.300.000
356	30-5-41	"	320.000	Incontavel	600.000	Incontavel
357	"	"	80.000	170.000	120.000	350.000
358	"	"	200.000	Incontavel	1.000.000	Incontavel
360	"	"	60.000	1.480.000	200.000	1.800.000
361	"	"	40.000	150.000	130.000	550.000
362	"	"	160.000	2.150.000	250.000	2.200.000
363	"	"	180.000	630.000	320.000	950.000
364	"	"	110.000	680.000	180.000	700.000
368	2-6-41	"	60.000	150.000	40.000	750.000
369	"	"	70.000	200.000	60.000	370.000
374	"	"	600.000	800.000	700.000	830.000
376	4-6-41	"	30.000	170.000	40.000	600.000
377	"	"	70.000	400.000	280.000	580.000
378	"	"	100.000	350.000	80.000	300.000
379	"	"	40.000	110.000	50.000	220.000
380	"	"	30.000	50.000	40.000	320.000
381	4-6-41	"	20.000	90.000	20.000	650.000
382	"	"	40.000	200.000	220.000	700.000
383	"	"	30.000	120.000	60.000	180.000
384	"	"	10.000	180.000	90.000	210.000
385	"	"	20.000	300.000	100.000	420.000
386	"	"	10.000	230.000	90.000	270.000
387	"	"	50.000	120.000	10.000	130.000
73	"	"	25.000	200.000	30.000	300.000

N.º	Data	Diluição	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.	Agar "standard" n.º de germes por cc.	Agar - leite n.º de germes por cc.
			37°C.	37°C.	32°C.	32°C.
74	4-6-41	1/10.000	150.000	400.000	80.000	500.000
389	5-6-41	"	100.000	210.000	370.000	400.000
390	"	"	120.000	580.000	280.000	1.280.000
393	"	"	190.000	100.000	100.000	250.000
394	"	"	80.000	60.000	120.000	Incontável
398	"	"	250.000	300.000	980.000	1.500.000

Afim de podermos proceder ao estudo comparativo entre os dois meios e as duas temperaturas, seleccionámos as nossas placas do seguinte modo:

QUADRO IV

	32°C.	37°C.
N.º de placas incontáveis só no agar "standard"	0	1
N.º de placas incontáveis só no agar-leite .....	13	15
N.º de placas incontáveis em ambos os meios ...	73	71

QUADRO V

	A. "standard"	A. leite
N.º de placas incontáveis só a 32°C. ....	29	22
N.º de placas incontáveis só a 37°C. ....	4	1
N.º de placas incontáveis em ambas as temperat.	57	50

Média calculada entre os 2 meios (agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado), com a incubação das placas a 32 e 37°C.:

QUADRO VI

	32°C.	37°C.
	Placas contáveis nos dois meios = 222	Placas contáveis nos dois meios = 334
$M_1$ = n.º médio de col. no leite .....	782658 ± 47446 (erro padrão da média)	752844 ± 40147 (erro padrão da média)
$M_{st}$ = n.º médio de col. no "standard"	520811 ± 36723 (erro padrão da média)	511796 ± 31991 (erro padrão da média)
$D = M_1 - M_{st}$ ....	261847	241048
$E_D$ = erro padrão de D .....	5997	53917
$\frac{D}{E_D}$ .....	4,36	4,47
P .....	100%	100%

Legenda:  $M_1$  = meio-leite;  $M_{st}$  = meio "standard"; D = diferença; P = porcentagem.

Média calculada entre as duas temperaturas (32 e 37°C.), com a incubação das placas feitas com os dois meios diferentes. A diferença que se vai notar entre a porcentagem do agar-leite e agar "standard" é devida ao fato de ser maior o número de placas incontáveis no meio de agar-leite, conforme se verifica nos quadros IV e V.

QUADRO VII

	Meio-leite	Meio "standard"
	Placas contáveis em ambas as temperaturas = 218	Placas contáveis em ambas as temperaturas = 234
$M_{32°C.}$ = n.º médio de col. a 32°C. ...	679341 ± 49028 (erro padrão da média)	587009 ± 43804 (erro padrão da média)
$M_{37°C.}$ = n.º médio de col. a 37°C. ...	583578 ± 39668 (erro padrão da média)	396068 ± 31350 (erro padrão da média)
$D = M_{32°C.} - M_{37°C.}$	95763	190941
$E_D$ = erro padrão de D .....	63066	53867
$\frac{D}{E_D}$ .....	1,52	3,70
P .....	87%	100%

## CONCLUSÕES

Pelo estudo comparativo de 398 amostras de leite pasteurizado, semeadas em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado e incubadas às temperaturas de 32 e 37°C., chegámos às seguintes conclusões:

- 1º) O emprego do agar-leite-triptona-glicosado, incubado à temperatura de 32°C., na contagem dos germes do leite em placas, dá em resultado um aumento de 100% sobre o agar "standard".
- 2º) A incubação a 32°C., em combinação com o agar-leite-triptona-glicosado, demonstrou ser mais favorável ao crescimento dos germes do leite do que a 37°C..
- 3º) As diferenças entre as médias do agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado, à temperatura de 37°C., e entre as médias do agar "standard" e agar-leite, à temperatura de 32°C., vêm demonstrar, de modo positivo, que essa diferença é real e não ocasional, provando assim que o agar-leite-triptona-glicosado é um meio mais favorável ao crescimento dos germes do leite do que o agar "standard", e esse crescimento é mais favorecido quando se emprega a temperatura de 32°C., em lugar de 37°C., para a incubação das placas.

## ABSTRACT

The comparative study of about 398 samples of pasteurized milk planted on standard agar and Tryptone-glucose milk agar, incubated at 32°C. and 37°C., led to the following conclusions:

- 1) An increase in count was observed in 100 per cent of the samples when planted on Tryptone-glucose milk agar, instead of standard agar, both incubated at 32°C..
- 2) Incubation at 32°C. in combination with the use of Tryptone-glucose milk agar, resulted in increases in plate count of considerably greater magnitude than were obtained by the use of the agar and incubation at 37°C..

- 3) The differences between the average of standard agar and Tryptone-glucose-milk-agar, at 37°C., and between the average of standard agar and milk agar, at 32°C., show very clearly that this difference is real and not occasional, thus proving the Tryptone-glucose-milk-agar to be a more convenient medium for the growth of the germs contained in milk than the standard agar. This growth is increased when there is used, for the incubation of the plates, a temperature of 32° instead of 37°C..

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — "Standard Methods of Milk Analyses", 1934, pg. 16.
- 2 — SAFFORD, C. E. and C. N. STARK — *J. Dairy Sci.*, 1937, 20:577 e *Am. Jour. Publ. Health*, 1936, 26:350.
- 3 — BREED, Robert S. — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1935, 25:663.
- 4 — YALE, M. W. and Carl S. PEDERSON — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1936, 26:344.
- 5 — BOWERS, C. S. and G. J. HUCKER — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1936, 26:350.
- 6 — YALE, M. W. — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1938, 28:148.
- 7 — ABELE, C. A. — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1939, 29:821.
- 8 — "Standard Methods for the Examination of Dairy Products", 1941, pg. 23.
- 9 — BREED, Robert S. and Carl S. PEDERSON — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1932, 22:745.
- 10 — YALE, M. W., Carl S. PEDERSON and Robert S. BREED — *Jour. Bacteriology*, 1933, 25:66.
- 11 — PEDERSON, Carl S. and M. W. YALE — *Amer. Jour. Publ. Health*, 1934, 24:477.