

## ESTUDO QUALI-QUANTITATIVO DA MICROBIOTA ANAERÓBIA EM AMOSTRAS DE QUEIJOS PROVOLONE, PARMESÃO E PRATO

ALBENONES JOSÉ DE MESQUITA<sup>1</sup>, ANTÔNIO NONATO DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, GABRIELA TEIXEIRA BORGES<sup>2</sup>, EDMAR SOARES NICOLAU<sup>1</sup>, ALBERTINA ALVES GUNDIM DUTRA SOUZA<sup>3</sup>

1. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, C.P. 131. 74001-970. Goiânia-GO

2. Pós-graduando da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

3. Médica Veterinária Autônoma.

### RESUMO

O presente estudo teve o propósito de quantificar, isolar e identificar as bactérias mais frequentes em amostras de queijos provolone, parmesão e prato, consideradas estufadas e normais, assim como determinar o pH e os níveis de nitrito e nitrato. Foram analisadas 120 amostras, compostas de queijo provolone (62), parmesão (36) e prato (22), produzidas em queijarias do Estado de Goiás e Minas Gerais. Nas amostras de queijos provolone, parmesão e prato, consideradas estufadas, foram isolados e identificados com maior frequência o *Clostridium butyricum* e o *Streptococcus intermedius*, enquanto nas consideradas normais as espécies mais frequentes foram

o *Streptococcus intermedius*, o *Actinomyces israeli* e o *Actinomyces naeslundii*. Em relação à quantificação das bactérias anaeróbias, não houve diferença significativa entre as amostras consideradas estufadas e normais. Os valores médios de pH, independentemente da condição do queijo, normal ou estufado, não apresentaram grandes variações, sendo a determinação considerada ineficaz para formar juízo a respeito do estufamento tardio dos queijos. As amostras consideradas estufadas não apresentaram nitrato e/ou nitrito, entretanto algumas normais mostraram-se positivas para a presença de nitrato e/ou nitrito, sendo a média de 2,06 ppm.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estufamento tardio, queijo, *Clostridium butyricum*, microbiologia.

### ABSTRACT

#### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE ANAEROBIC MICROBIOTA IN CHEESE

The present study was designed to quantify, isolate and identify the most frequent bacteria in samples of provolone, parmesão and prato cheese in late blowing and in normal condition as well as to determine the pH and the rate of nitrite and nitrate concentrations. The amount of 120 samples, being 62 of provolone, 36 of Parmesan and 22 of prato, produced by cheese factories in the states of Goiás and Minas Gerais were analysed. *Clostridium butyricum* and *Streptococcus intermedius* were more frequently isolated and identified in samples of provolone, Parmesan and prato cheese regarded as in late blowing, while in those samples regarded as normal condition the

most frequent bacteria were *Streptococcus intermedius*, *Actinomyces israeli* and *Actinomyces naeslundii*. No statistical significant difference was seen on the quantification of anaerobic bacteria among the samples of different kinds of cheese regarded as in late blowing and in normal condition. The mean values for pH, independently of the cheese condition, didn't show any significant variation and the method was considered to be inappropriate to conclude about the late blowing. In the normal condition samples nitrite and/or nitrate were found in a mean concentration of 2,06 ppm.

**KEY WORDS:** Late blowing, cheese, *Clostridium butyricum*, microbiology.

## INTRODUÇÃO

O estufamento tardio constitui um defeito freqüentemente observado nos queijos de massa semicozida ou cozida e de maturação prolongada (Furtado, 1985).

Bactérias formadoras de esporos do gênero *Clostridium* spp. têm sido apontadas como responsáveis por alterações do leite, principalmente as espécies *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. sporogenes*. Esses microrganismos caracterizam-se como bastonetes móveis, Gram-positivos, medem de 0,8 a 6,0 mm de comprimento e crescem em uma faixa de temperatura ideal de 32° a 37°C, e de pH entre 6,8 e 7,0 (Furtado, 1990).

Autores como Bottazzi et al. (1993) e Stadhouders et al. (1983) foram unânimes em afirmar que a contaminação dos queijos é proveniente da contaminação inicial do leite. A matéria-prima contamina-se principalmente com as fezes dos animais que foram arraçoados com silagem de milho (Bérgere & Hermier, 1970). Bergère & Sivela (1990) relataram que o número de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* presentes no leite era dependente da qualidade da silagem e da higiene da ordenha.

O defeito pode manifestar-se nos queijos de forma localizada ou generalizada, quando a acidez produzida pelas bactérias lácticas, ou ácido láctico, for destruída pelos fermentadores do lactato, como as espécies de *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. sporogenes* (Frazier, 1958).

Em geral, o estufamento manifesta-se no período de 10 dias até oito semanas após a fabricação do produto. Os queijos apresentam-se bastante inchados, com áreas descoradas e macias, odor desagradável e sabor estranho (Senik et al., 1989). Internamente, observam-se olhaduras grandes e irregulares na massa, resultantes de processo fermentativo que leva à produção de hidrogênio (H<sub>2</sub>), gás bastante inflamável (Battistotti et al., 1970).

Suspeita-se que os queijos de massa dura sejam mais susceptíveis ao problema. Sabe-se, por exemplo, que os queijos parmesão e o Emmental são os mais afetados, enquanto o Gouda e o Tilsit são os menos atingidos. Entretanto, não há uma ex-

plicação definitiva para esse fato. Outro fator a se considerar é a espessura da casca dos queijos parmesão e Emmental, que poderia facilitar a retenção dos gases na massa e provocar o estufamento. Parecem influenciar também o teor de sal, a umidade e o pH. Estudos conduzidos sobre a fermentação butírica no queijo Edam apontam para intensificação do problema quando são utilizadas embalagens de películas plásticas impermeáveis (Furtado, 1985).

No Brasil, realizaram-se pouquíssimos trabalhos que enfocam o tema, e os existentes normalmente caracterizam-se como artigos de revisão.

Somente após considerar o exposto, a importância que representa o assunto para a indústria laticinista, especialmente para os fabricantes de queijos, e a necessidade do conhecimento específico dos agentes responsáveis pela alteração, é que se pode pensar em medidas de controle. Assim, o presente trabalho teve como objetivos quantificar, isolar e identificar as bactérias anaeróbias mais freqüentemente envolvidas no estufamento tardio de queijos provolone, parmesão e prato, bem como determinar a microbiota desses produtos considerados normais, além de determinar o pH e os níveis de nitrito e nitrato dessas amostras.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas, tendo em vista a quantificação, isolamento e identificação de bactérias anaeróbias, 120 amostras compostas de queijos provolone (62), parmesão (36) e prato (22), produzidas em queijarias dos Estados de Goiás e Minas Gerais e colhidas no comércio varejista de Goiânia – GO, no período de setembro de 1996 a agosto de 1998.

Queijos que apresentavam sinais evidentes de alterações, considerados estufados, e queijos sem sinais de alterações, considerados normais, compuseram a amostragem. Cada peça representou uma unidade que, uma vez colhida, foi transportada em caixa isotérmica ao Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA), da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, para as análises.

Para a contagem e identificação das bactérias anaeróbias, foram pesados, asépticamente, 25 gramas de cada queijo e homogeneizadas em "Stomacher", juntamente com 225 mL de citrato de sódio, a 2%, durante 120 segundos, obtendo-se assim a diluição de  $10^{-1}$ .

A partir da diluição  $10^{-1}$ , foram realizadas diluições decimais seriadas sucessivas em tubos contendo 9,0 mL de citrato de sódio, a 2%, até a diluição de  $10^{-5}$ . De cada diluição foi retirada uma alíquota de 2,0 mL, sendo 1,0 mL inoculado em placas de Petri (90 x 120 mm), contendo 20 mL ágar RCM (Reinforced Clostridial Medium), e o outro em 20 mL de ágar SPS (Sulfito de Polimixina Sulfadiazina). A semeadura foi realizada em sobrecamadas, para ambos os meios. As placas foram acondicionadas em jarra de anaerobiose e incubadas a 37°C, durante 96 horas. Após este período, fez-se a contagem, expressando os resultados em unidades formadoras de colônia – UFC por grama. A partir daí, selecionaram-se e colheram-se todas as unidades morfológicamente distintas, objetivando sua purificação e identificação. Utilizou-se o sistema API-20 A (bio Mérieux, France), conforme recomendação do fabricante, para a identificação das unidades selecionadas.

As determinações quali-quantitativas de nitrato e nitrito, bem como a determinação do pH, foram realizadas de acordo com as recomendações do Ministério da Agricultura, 1981.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste "t" de Student, e agrupados em tabelas e figuras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a distribuição das amostras de queijo provolone em função da condição, normal ou estufada, do número de cepas, bem como das espécies bacterianas identificadas. Das 24 amostras consideradas estufadas foi possível isolar 24 cepas de *Clostridium butyricum*, ou seja, em 100% delas, porém outras espécies bacterianas foram também isoladas. A literatura registra a importância do papel desempenhado pelo *Clostridium butyricum*

e *Clostridium tyrobutyricum* no desenvolvimento do estufamento tardio dos queijos (IDF 251, 1990; Klijn et al., 1995).

Embora o *Clostridium tyrobutyricum* seja a espécie mais frequentemente apontada no estufamento tardio dos queijos, esporos de outros *Clostridium*, particularmente de *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium sporogenes*, têm sido encontrados em queijos e em leite cru. Desde que todas estas espécies são capazes de produzir ácido butírico e gás hidrogênio em vários meios, a correlação entre o aparecimento do defeito e a presença de uma espécie específica de Clostridia torna-se difícil (Klijn et al., 1995).

Bottazzi et al. (1993) afirmaram que o *Clostridium butyricum* desenvolve-se muito rapidamente, proporcionando a formação de grande número de microcolônias, formadas de grande número de células, com correspondente produção intensa de gás e estufamento com forte deformação do queijo. As Figuras 1 e 2 confirmam as observações dos autores.

Das 38 amostras de queijo provolone consideradas normais, foi possível isolar seis cepas de *Clostridium butyricum*, além de outras cepas bacterianas (Tabela 1). A espécie *Clostridium butyricum*, embora presente em seis amostras consideradas normais, não provocou estufamento, o que reforça a hipótese de que não é suficiente a presença do microrganismo para provocar o defeito, mas sim a presença aliada ao número mínimo.

Pode-se observar na Tabela 2 que das 33 amostras de queijo parmesão consideradas normais foram isoladas 22 cepas de *Streptococcus intermedius*, 18 de *Actinomyces israeli*, 7 de *Clostridium butyricum*, 4 de *Actinomyces naeslundii*, 1 de *Actinomyces viscosus* e 1 de *Staphylococcus* spp. De forma semelhante ao que ocorreu com as amostras de queijo provolone consideradas normais, as espécies mais frequentes foram o *Streptococcus intermedius* e o *Actinomyces israeli*, sucedendo o mesmo ao *Clostridium butyricum* e ao *Actinomyces naeslundii*.

**TABELA 1.** Distribuição das amostras de queijo provolone, em função da condição, normal/estufada, do número de cepas e das espécies bacterianas isoladas. Goiânia – GO, 1998.

| Condição              | Nº de cepas (%) | Espécie Bacteriana                |
|-----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Normal 38 ( n = 62)   | 6 (15,79)       | <i>Clostridium butyricum</i>      |
|                       | 20 (52,63)      | <i>Streptococcus intermedius</i>  |
|                       | 16 (42,10)      | <i>Actinomyces israeli</i>        |
|                       | 4 (10,52)       | <i>Actinomyces naeslundii</i>     |
|                       | 3 (7,9)         | <i>Lactobacillus fermentum</i>    |
|                       | 1 (2,63)        | <i>Staphylococcus sp.</i>         |
|                       | 3 (7,9)         | <i>Actinomyces viscosus</i>       |
|                       | 4 (10,52)       | <i>Actinomyces ramosum</i>        |
|                       | 2 (5,26)        | <i>Clostridium clostridiforme</i> |
| Estufado 24 ( n = 62) | 24 (100)        | <i>Clostridium butyricum</i>      |
|                       | 15 (62,5)       | <i>Streptococcus intermedius</i>  |
|                       | 2 (8,33)        | <i>Clostridium tyrobutyricum</i>  |
|                       | 1 (4,16)        | <i>Lactobacillus jensenii</i>     |
|                       | 2 (8,33)        | <i>Actinomyces viscosus</i>       |
|                       | 1 (4,16)        | <i>Actinomyces israeli</i>        |
|                       | 1 (4,16)        | <i>Actinomyces naeslundii</i>     |
|                       | 1 (4,16)        | <i>Clostridium ramosum</i>        |
|                       | 1 (4,16)        | <i>Clostridium clostridiforme</i> |

**TABELA 2.** Distribuição das amostras de queijo parmesão, em função da condição, normal/estufada, do número de cepas e das espécies bacterianas isoladas. Goiânia – GO, 1998.

| Condição          | N.º de cepas (%) | Espécie Bacteriana               |
|-------------------|------------------|----------------------------------|
| Normal 33 (n=36)  | 22 (66,66)       | <i>Streptococcus intermedius</i> |
|                   | 7 (21,21)        | <i>Clostridium butyricum</i>     |
|                   | 18 (54,54)       | <i>Actinomyces israeli</i>       |
|                   | 4 (12,12)        | <i>Actinomyces naeslundii</i>    |
|                   | 1 (3,03)         | <i>Actinomyces viscosus</i>      |
|                   | 1 (3,03)         | <i>Staphylococcus sp.</i>        |
|                   | 3 (9,09)         | <i>Clostridium butyricum</i>     |
| Estufado 3 (n=36) | 2 (66,66)        | <i>Streptococcus intermedius</i> |
|                   | 1 (33,33)        | <i>Actinomyces naeslundii</i>    |

Além disso, observa-se também que, embora somente três amostras de queijo parmesão consideradas estufadas tenham sido analisadas, de todas elas foi possível isolar o *Clostridium butyricum*. O *Streptococcus intermedius* foi a outra espécie mais

frequente. Fato semelhante ocorreu com as amostras de queijo provolone consideradas estufadas.

De acordo com Senik et al. (1989), várias espécies de *Clostridium* têm sido detectadas no leite, no queijo e em outros produtos lácteos. Espécies de

Clostridia mais frequentemente implicadas na deterioração de queijos são *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes* e *Clostridium tyrobutyricum*.

Segundo Rosen et al. (1989), o *Clostridium tyrobutyricum* é o responsável pelo estufamento tardio de queijos duros e de massa cozida. No queijo, essa bactéria utiliza o lactato para produzir CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, ácido acético e ácido butírico. Os gases liberados causam o estufamento do queijo, enquanto o ácido butírico acima da concentração crítica de 200 mg/l confere sabor desagradável. Ainda, segundo os autores, um número relativamente baixo de esporos do microrganismo no leite, 200/litro, é suficiente para causar defeito no queijo.

A distribuição das amostras de queijo prato, em função da condição normal ou estufada, do número de cepas, e das espécies de bactérias isoladas e identificadas, pode ser vista na Tabela 3. Das 20 amostras consideradas estufadas, isolaram-se 20 cepas de *Clostridium butyricum*, 4 de *Streptococcus intermedius* e 4 de *Actinomyces israelii*. Ainda que somente duas amostras de queijo consideradas normais tenham sido analisadas, isolaram-se duas cepas de *Streptococcus intermedius* e um de *Actinomyces israelii*. Como mostram os resultados, tanto nas amostras consideradas estufadas, como nas normais, as espécies bacterianas mais frequentemente isoladas nos queijos pratos foram as mesmas dos queijos provolone e parmesão.

As bactérias do gênero *Clostridium* mais comumente encontradas no leite e em produtos lácteos pertencem às espécies *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium sporogenes* e *Clostridium bif fermentans*. Embora o *Clostridium butyricum* pertença ao grupo, o *Clostridium tyrobutyricum* é a principal bactéria causadora do defeito (IDF 251, 1990). De acordo com Bergère & Hermier (1970), os esporos das bactérias são introduzidos no leite cru durante a ordenha através da contaminação com esterco. Os autores afirmam também que a silagem de baixa qualidade microbiológica tem sido incriminada como fonte de esporos para vacas leiteiras.

Toyoda et al. (1990) identificaram os microrganismos causadores de estufamento tardio em queijo Gouda fabricado no Japão. Os queijos foram produzidos com leite não bactofugado da estação de inverno e sem adição de nitrato. De 105 colônias negras isoladas no ágar DRCM (Differential Reinforced Clostridial Medium), 86 eram de *Clostridium sporogenes*, 11 de *Clostridium beijerinckii* e 8 de *Clostridium butyricum*. Todas as colônias marrons do ágar DRCM foram identificadas como *Clostridium tyrobutyricum* e estiveram presentes em níveis de 10<sup>2</sup> - 10<sup>4</sup> UFC/g nos queijos estufados e abaixo de 10<sup>1</sup> UFC/g nos queijos normais. Os autores acreditam que o estufamento tardio em queijo Gouda japonês tenha sido causado por *Clostridium tyrobutyricum*.

No presente estudo, o *Clostridium butyricum* foi o microrganismo mais frequentemente isolado de amostras de queijos provolone e prato consideradas estufadas. Esse resultado provavelmente se deveu à metodologia empregada, ao fato de poucas vacas leiteiras receberem silagem na alimentação e ao efeito diluição. Torna-se importante ressaltar que a maioria das vacas leiteiras do Estado de Goiás continua sendo alimentada a pasto, principalmente no período de chuvas. Mas esse quadro vem mudando bruscamente e num futuro próximo os resultados de um trabalho semelhante a este poderão ser bastante diferentes.

A Figura 3 mostra a comparação de valores médios das contagens, em UFC, de bactérias anaeróbias em ágar RCM, em amostras de queijos provolone, parmesão e prato. Verifica-se que as amostras consideradas normais apresentaram média 6,06 e desvio-padrão 1,07, e as estufadas média 6,05 e desvio-padrão 2,07. Quando analisadas estatisticamente, não mostraram diferenças significativas, pelo teste "t" a 5% .

As mesmas amostras foram também semeadas em ágar SPS, conforme pode ser observado na Figura 4. As consideradas normais apresentaram média 5,49 e desvio-padrão 1,02, as estufadas média de 5,44 e desvio-padrão 1,19. Quando comparadas pelo teste t a 5%, não mostraram diferenças significativas. A partir desses dados, pode-se inferir que a contagem do(s) microrganismo(s) incriminado(s) no

estufamento tardio dos queijos possui um papel de maior relevância que a contagem de bactérias anaeróbias.

Na Tabela 4 estão distribuídos os dados relativos às amostras de queijos provolone, parmesão e prato, em função da condição, normal ou estufada, e da presença ou ausência de nitrato/nitrito. Nota-se que nenhuma das amostras de provolone (24), prato (20) e parmesão (3), consideradas estufadas, apresentaram nitrato e/ou nitrito. Mas amostras de provolone (19), parmesão (12) e prato (1), consideradas normais, mostraram-se positivas para a presença de nitrato e/ou nitrito. Os níveis de nitrato/nitrito detectados variaram de 0,01 a 21,0 ppm, sendo a

média de 2,06 ppm. De acordo com Toyoda et al. (1990), a germinação de esporos de Clostridia é fortemente inibida por concentração de nitrito da ordem de 0,005%. Nota-se, ainda na Tabela 4, que amostras de queijo provolone (19), parmesão (21) e prato (1), também consideradas normais, não apresentaram níveis de nitrato e/ou nitrito que pudessem ser detectados pela técnica empregada no presente estudo. Esses dados revelam a importância do nitrato e/ou nitrito na prevenção do estufamento tardio dos queijos, mas revelam também a viabilidade de produzir queijos sem o uso desses aditivos intencionais.

**TABELA 3.** Distribuição das amostras de queijo prato, em função da condição, normal/estufada, do número de cepas e das espécies bacterianas isoladas. Goiânia – GO, 1998.

| Condição           | Nº de cepas (%) | Espécie bacteriana               |
|--------------------|-----------------|----------------------------------|
| Normal 2 (n=22)    | 2 (100)         | <i>Streptococcus intermedius</i> |
|                    | 1 (50)          | <i>Actinomyces israeli</i>       |
| Estufado 20 (n=22) | 20 (100)        | <i>Clostridium butyricum</i>     |
|                    | 4 (20)          | <i>Streptococcus intermdius</i>  |
|                    | 4 (20)          | <i>Actinomyces israeli</i>       |

**TABELA 4.** Distribuição das amostras de queijo em função da condição, normal/estufada, e da presença ou ausência de nitrato/nitrito. Goiânia – GO, 1998.

| Tipos de queijos | N.º de amostra normal | N.º de amostra estufada | Presença nitrato/nitrito * (%) | Ausência nitrato/nitrito (%) |
|------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Provolone        | -                     | 24                      | -                              | 24                           |
| Provolone        | 19                    | -                       | 19                             | -                            |
| Provolone        | 19                    | -                       | -                              | 19                           |
| Parmesão         | 12                    | -                       | 12                             | -                            |
| Parmesão         | -                     | 3                       | -                              | 3                            |
| Parmesão         | 21                    | -                       | -                              | 21                           |
| Prato            | 1                     | -                       | -                              | 1                            |
| Prato            | 1                     | -                       | 1                              | -                            |
| Prato            | -                     | 20                      | -                              | 20                           |
| Total            | 73 ( 60,83%)          | 47 ( 39,17%)            | 32 ( 26,27%)                   | 88 ( 73,33%)                 |

\* Os níveis de nitrato e/ou nitrito variaram de 0,01 a 21,0 ppm, sendo a média de 2,06 ppm.

Os valores médios de pH, segundo os tipos de queijos e a condição da amostra, podem ser obser-

vados na Tabela 5. Verifica-se que entre os tipos de queijo, independentemente da condição, normal ou

estufado, não foram observadas grandes variações nas médias. Depreende-se, portanto, que esse parâmetro, isoladamente, não deve ser utilizado para formar juízo a respeito do estufamento tardio dos queijos. Segundo Toyoda et al. (1990), em diferentes concentrações salinas o valor do pH influencia

fortemente na germinação do esporo de *Clostridium tyrobutyricum*. Para esses autores, concentrações de 2% de cloreto de sódio a pH 5,0, 4% de cloreto de sódio a pH 5,5 e 6% de cloreto de sódio a pH 6,0–6,5 preveniram a germinação de esporos.

**TABELA 5.** Distribuição dos valores médios de pH segundo os tipos de queijos e a condição da amostra, normal/estufada.

| Tipos de queijos | N.º de amostra normal | N.º de amostra estufada | Médias de pH |          |
|------------------|-----------------------|-------------------------|--------------|----------|
|                  |                       |                         | normal       | estufada |
| Provolone        | 38                    | 24                      | 5,46         | 5,35     |
| Parmesão         | 33                    | 3                       | 5,3          | 5,08     |
| Prato            | 2                     | 20                      | 5,65         | 5,60     |
| TOTAL            | 73                    | 47                      | -            | -        |

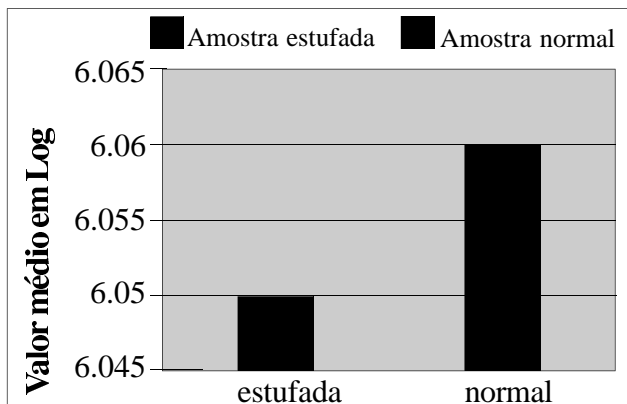
**FIGURA 1.** Queijo parmesão apresentando sinais de estufamento tardio.



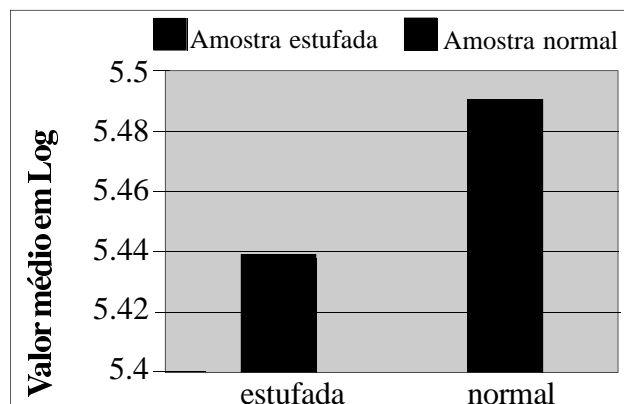
**FIGURA 2.** Queijo provolone apresentando sinais de estufamento tardio.



**FIGURA 3.** Comparação de médias de contagem de bactérias anaeróbias em UFC, em amostras de queijos provolone, parmesão e prato, em ágar RCM. Goiânia – GO, 1998.



**FIGURA 4.** Comparação de média de contagem de bactérias anaeróbias em UFC, em amostras de queijos provolone, parmesão e prato, em ágar SPS. Goiânia-GO, 1998.



## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

– em amostras de queijos provolone e prato, consideradas estufadas, foram isoladas e identificadas, com maior frequência, *Clostridium butyricum* e *Streptococcus intermedius*, enquanto nas amostras normais, incluindo o parmesão, as espécies mais frequentes foram *Streptococcus intermedius*, *Actinomyces israelii* e *Actinomyces naeslundii*;

– independentemente do ágar utilizado – RCM ou SPS – na quantificação das bactérias anaeróbias, as amostras consideradas normais e estufadas não mostraram diferenças significativas;

– nitratos/nitritos mostraram ser eficientes na prevenção do estufamento tardio dos queijos provolone, parmesão e prato. Mas os resultados mostraram também a viabilidade de produzir queijos sem a adição desses aditivos intencionais;

– o pH, isoladamente, não deve ser usado para formar juízo em relação ao estufamento tardio.

## REFERÊNCIAS

- BATTISTOTT, B., PERMI, L., BOTTAZZI, V. & CLARI, L. Caratteristiche microbiologiche del latte impiegato nella produzione de formaggio Grana. *Sci. Tec. Lac. Cas.* v. 21, n.6, p. 397-401, 1970.
- BERGÈRE, J. L., HERMIER, J. Spore properties of Clostridia occurring in cheese. *J. Appl. Bact.*, v. 33, p. 167-179, 1970.
- BERGÈRE, J. L., SIVELA, S. Detection and enumeration of Clostridial spores related to cheese quality: classical and new methods. In: Methods for detection and prevention of anaerobic spore former in relation to the quality of cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 251, p. 15-23, 1990.
- BOTTAZZI, V., BATTISTOTTI, B., CAPPA, F., REBECCHI, A., BERTUZZI, S., BRAMBILLA, E. Germinazione delle spore di *Clostridium* ed azione del lisozima in formaggio grana. *Scienza e Técnica Lattiero-casearia*, v. 44, n. 2, p. 79-96, 1993.
- FRAZIER, W. C. *Food Microbiology*. Toronto: Mc Graw-Hill Book Company, INC. 1958, 472 p.
- FURTADO, M. M. O estufamento tardio dos queijos: características e prevenção, uma revisão. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v. 40, n. 242, p. 3-39, 1985.
- FURTADO, M. M. *A arte e a ciência do queijo*. São Paulo: Ed. Globo, 1990, 297 p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION-IDF. Methods of detection and prevention of anaerobic spore formers in relation to the quality of cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 251, p. 17-23, 1990.
- KLIJN, N., NIEUWENHOF, F. F., HOOLWERF, J. D., WALLS, C. B. van der., WEERKAMP, A. H. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species: specific PCR amplification. *Appl. Environ Microbiol.*, v. 61, n. 8, p. 2919-2924, 1995.
- MÉTODOS ANALÍTICOS DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. Secretaria Nacional de Defesa Animal – SNAD. Brasília – Distrito Federal, 1981.
- ROSEN, B., MERIN, U., ROSENTHAL. Evaluation of Clostridia in raw milk. *Milchwissenschaft*, v. 44, n. 6, p. 355-357, 1989.
- SENIK, G. F., SCHEIB, J. A., BROWN, J. M., LEDFORD, R. A. Evaluation of methods for determination of spore-formes responsible for the late gas blowing defect in cheese. *J. Dairy Sci.*, v. 72, n. 2, p. 360-366, 1989.
- STADHOUDERS, J., HUP, G., NIEUWENHOF, F. F. J. *Silage and cheese quality*. Nizo mededeling M 19 A. Netherlands Institute for Dairy Research, Ede, The Netherlands, 1983.
- TOYODA, S., KOBAYASHI, Y., AHIRD, K. Isolation and characterization of Clostridia from Gouda Cheese with late gas – blowing. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, v. 61 n. 7, p. 591-598, 1990.