

ODÍVIA OLIVEIRA ROSA

INFLUÊNCIA DO MEIO DE ENRIQUECIMENTO NA RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS INJURIADAS PARA ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS — MINAS GERAIS

1 9 8 3



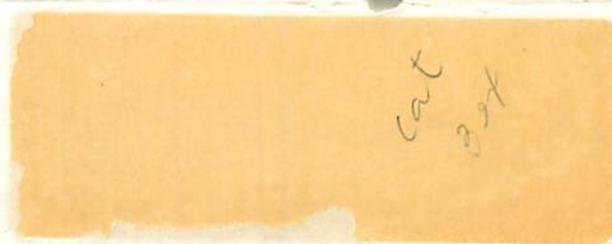
ODÍVIA OLIVEIRA ROSA

INFLUÊNCIA DO MEIO DE ENRIQUECIMENTO NA RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS INJURIADAS PARA ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS — MINAS GERAIS

1 9 8 3



O LIVRO OLIVEIRA ROSA

DESCRIÇÃO DO MEU E ENRIQUECIMENTO NA DOUTRINA  
DE FERRAZ DE OLIVEIRA INQUIRIDA PARA  
EXAMENHO DE COLÉGIO

Este livro trata da doutrina de Ferraz de Oliveira  
e do seu desenvolvimento na doutrina de Ferraz de Oliveira  
e do seu desenvolvimento na doutrina de Ferraz de Oliveira  
e do seu desenvolvimento na doutrina de Ferraz de Oliveira

OLIVEIRA ROSA

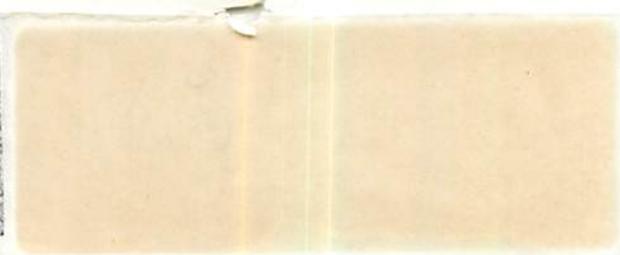
OLIVEIRA ROSA

OLIVEIRA ROSA

OLIVEIRA ROSA

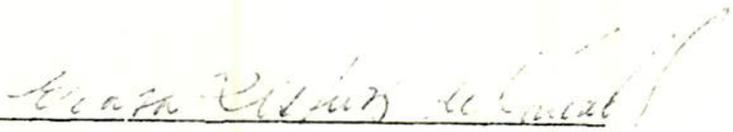
OLIVEIRA ROSA

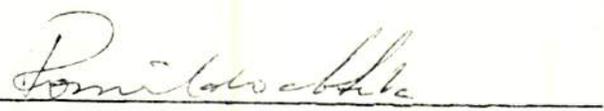
OLIVEIRA ROSA



INFLUÊNCIA DO MEIO DE ENRIQUECIMENTO NA RECUPERAÇÃO DE  
CÉLULAS INJURIADAS PARA ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES

APROVADA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. ELIANA PINHEIRO DE CARVALHO  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. ROMILDO DA SILVA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. JOSÉ OSWALDO DE SIQUEIRA

## BIOGRAFIA DA AUTORA

ODÍVIA OLIVEIRA ROSA, filha de Edgard Moreira Rosa e Odívia Oliveira Rosa, nascida à 14 de abril de 1950, na cidade de Santo Amaro da Purificação no Estado da Bahia.

Iniciou seus estudos de nível superior em 1971, na Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia, tendo-o concluído em agosto de 1974, obtendo o título de Nutricionista. Ainda no mesmo ano, foi contratada pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Seção de Fiscalização de Alimentos, atuando como Inspetor Técnico.

Em janeiro de 1977, ingressou no curso de Especialização em Tecnologia e Higiene dos Alimentos, ministrado pela "Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid - España", concluindo em outubro do mesmo ano.

Foi contratada pela Universidade Federal de Mato Grosso em março de 1978, a nível de Auxiliar de Ensino, para coordenar e Implantar o curso de Graduação em Nutrição. Em agosto do mesmo ano foi nomeada Chefe do Departamento de Nutrição da UFMT,

permanecendo no cargo até agosto de 1981. Prestou concurso para professor Assistente na cadeira de Higiene e Controle dos Alimentos na referida Universidade em maio de 1979.

Em 1980 foi nomeada membro efetivo do Conselho Regional de Nutricionista 1.<sup>a</sup> Região.

Foi enquadrada na Classe de Professor Adjunto, nível II, da UFMT em setembro de 1982.

Ingressou no Curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras em março de 1982, onde iniciou seu experimento de tese em maio do mesmo ano, concluindo-o em novembro de 1983.

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Valores médios de enumeração de coliformes totais a pós 48 horas de incubação em um meio líquido (NMP) e 24 horas em um meio sólido (CDP) .....	45
2 Valores médios de contaminação fecal obtidos através de diferentes técnicas de enumeração do grupo coliformes fecais .....	46
3 Valores médios de coliformes fecais e <i>E. coli</i> obtidos através de diferentes técnicas de enumeração de coliformes fecais .....	49
4 INViC das culturas de <i>Escherichia coli</i> isoladas através de diferentes técnicas para a enumeração de coliformes fecais .....	53
5 Total de microorganismos isolados por técnica com ou sem produção de gás .....	55

## Tabela

## Página

6	Número de tubos gás-positivo ( $G^+$ ) relacionados com microorganismos isolados .....	57
7	Número de tubos gás-negativos ( $G^-$ ) relacionados com organismos coliformes isolados .....	58
8	Bactérias associadas com teste NMP falso-positivo .	59

## LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Técnicas utilizadas para isolamento de coliformes totais e fecais com o uso de pré-enriquecimento ...	38
2 Técnicas utilizadas para isolamento de coliformes totais e fecais pelos métodos padrões .....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Preparo e tratamento das amostras .....	40

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE QUADROS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	7
2.1. Conceito de injúria celular .....	7
2.2. Causas e agentes agravantes da injúria celular .	9
2.3. Influência da temperatura do agar na recuperação de células injuriadas .....	12
2.4. Presença de agentes inibitórios nos meios seleti vos .....	14
2.5. Limitações do método do número mais provável (NMP) .....	16
2.5.1. Presença de reações falso-negativas nos testes de número mais provável (NMP) ...	18
2.5.2. Presença de bactérias associadas com tes tes falso-positivos .....	20

2.5.3.	Associação do aparecimento de brilho metálico característico em placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) com testes falso-positivos .....	24
2.6.	Manifestações de injúria celular .....	25
2.7.	Recuperação de injúria celular .....	26
2.7.1.	Processo de reparo celular .....	29
2.7.2.	Período de reparo (pré-enriquecimento) .	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3.1.	Material .....	37
3.2.	Preparo da amostra .....	39
3.3.	Método de repicagem e interpretação dos dados ..	39
3.4.	Isolamento e provas bioquímicas .....	41
3.5.	Tratamento estatístico .....	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1.	Coliformes totais e fecais .....	44
4.2.	Isolamento e enumeração de <i>Escherichia coli</i> ....	48
4.3.	Interferência de organismos coliformes não-fecais na seletividade de <i>E. coli</i> .....	52
4.4.	Associação de reações falso-negativas e falso-positivas ao isolamento e recuperação de <i>E. coli</i> .	56
5.	CONCLUSÕES .....	62
6.	RESUMO .....	65
7.	SUMMARY .....	67

Página

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
APÊNDICE .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo dos microorganismos, suas atividades, seus efeitos benéficos e prejudiciais ao homem, além das alterações físicas e químicas que provocam em seu meio ambiente, são preocupações constantes dos órgãos de saúde pública e laboratórios de controle de qualidade. Felizmente, a maioria dos microorganismos é inócua para o homem, o qual possui alguma resistência à invasão daqueles que são potencialmente patógenos.

A utilização dos organismos do grupo coliforme como indicadores de contaminação fecal, está historicamente baseada no desenvolvimento sanitário dos padrões de saneamento da água e à problemas inerentes associados com tais materiais (27, 34, 35, 68).

Após um longo período de estudos e experiências com o intuito de elaborar técnicas mais precisas para enumeração e isolamento de microorganismos do grupo coliforme, foi proposto um esquema para detecção deste grupo na água, FISHBEIN & SURKIEWICZ (22).

A partir daí, metodologia semelhante foi aplicada a todos os alimentos para verificação da insanidade dos mesmos, produzida pela presença destes organismos (11, 52, 55, 69, 71). Contudo há grande evidência na literatura de que os métodos comumente usados na detecção de indicadores fecais, são insatisfatórios quando aplicados a produtos alimentícios processados, BISSONNETTE et alii (5), FISHBEIN et alii (21) e MAXCY (38).

O grupo coliforme, ou mais especificamente a *Escherichia coli* (*E. coli*), é usado como indicador de contaminação fecal em alimentos. De acordo com FISHBEIN & SURKIEWICZ (22), isto se deve ao fato do produto alimentício não ser inerte e poder afetar fisiologicamente seu próprio meio, além de conter uma flora microbiana competitiva que poderia afetar o desenvolvimento dos organismos indicadores fecais. Finalmente é citado também que o manuseio e estocagem dos produtos alimentícios poderiam debilitar células microbianas, OLSON (49) e FISHBEIN & SURKIEWICZ (22).

HACKNEY, RAY & SPECK (25), relatam que bactérias como enterococos, coliformes e coliformes fecais usadas como índice de contaminação fecal, tornam-se inabilitadas para formarem colônias em meios de plaqueamento seletivos, quando submetidas anteriormente a ambiente de stress. ORDAL et alii (50), observaram que alimentos submetidos a aquecimento, resfriamento, congelamento, dessecação, irradiação, alta pressão osmótica e baixa atividade de água, assim como aqueles que mantiveram contato com superfícies de equipamentos sanitizados, podem conter bactérias fisiologi

camente deficientes, devido ao stress ambiental a que foram expostos.

Um estudo do reparo dessas células parcialmente lesadas, torna-se de importância fundamental em análises bacteriológicas de alimentos processados, uma vez que estas células têm demonstrado resultados insatisfatórios quando da detecção e enumeração nas análises de laboratório, MAXCY (38).

No grupo coliforme, além da *E. coli*, são incluídas espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella* que são organismos que podem crescer e persistir por longos períodos em habitat não fecal. Estes têm sido usados para indicar uma contaminação pós-processamento e um grau de sanidade inadequado, naqueles alimentos que receberam tratamento específico para removê-los, THATCHER & CLARK (71).

A *E. coli* destaca-se entre as demais bactérias do grupo coliforme, não pela sua patogenicidade, mas essencialmente por ser o principal indicador da negligência e não observância das normas de higiene com que os alimentos são manipulados e processados, (27, 44, 69, 71). Por outro lado, para se obter melhores resultados quanto à contagem total de *E. coli*, faz-se indispensável novos estudos que facilitem o isolamento e identificação desses microorganismos, devido a algumas limitações das contagens nos meios seletivos, MAXCY (38). Essas limitações são apresentadas principalmente pela temperatura de fusão do agar e pelos com

ponentes seletivos que agiriam inibindo o crescimento de células que se apresentassem parcialmente lesadas, HARTMAN, HARTMAN & LANZ (26) e RAY & SPECK (57).

RAY & SPECK (59), consideram provável a presença de células coliformes debilitadas em queijos moles. A esse stress subletal, alguns autores (18, 31, 54), reportam o fato dos produtos lácteos possuírem uma flora láctica capaz de produzir agentes antimicrobianos que poderiam afetar o desenvolvimento de outros organismos presentes e posteriormente dificultarem a enumeração e o isolamento dos coliformes.

Por outro lado MAXCY (38), em seus estudos sobre injúria sub-letal de microorganismos em leite e produtos lácteos, observou que a lesão celular ocorria quando estes produtos eram submetidos a tratamentos térmicos, exposição ao cloro e cloreto de sódio, refrigeração e descongelamento. O autor verificou ainda uma redução no número total de microorganismos testados, quando estes foram submetidos à diferentes concentrações de NaCl, constatando que estes foram incapazes de se recuperarem nos meios seletivos usados, devido à injúria sub-letal sofrida.

É sabido que, a fabricação de queijos frescais, de forma artesanal, é muito difundida na região Sul do Estado de Minas Gerais, sendo elaborado em pequena escala como consequência do aproveitamento do leite produzido e não destinado ao consumo ou comercialização industrial. De acordo com VIEIRA & LOURENÇO NETO

(73), esses queijos são produtos originados da coagulação do leite integral, pasteurizado ou não, por enzimas ou por acidificação natural, salgados e conservados sob diversas condições de temperatura.

A não observância das normas de higiene condiciona esse produto a uma contaminação adicional por organismos indicadores fecais, algumas vezes impossibilitados de produzirem respostas significativas nos meios usuais de detecção, devido, supostamente, ao stress ambiental produzido pela acidificação e salga desses produtos.

REINBOLD (64), observa que, embora as contagens totais sejam essencialmente sem significado na avaliação das boas práticas de fabricação de queijos, a enumeração de leveduras, mofos e coliformes, contudo, são frequentemente empregadas como controle de processamento e sanidade. Entretanto, o referido autor sugere que os testes usuais para detecção destes organismos deveriam ser aperfeiçoados, buscando uma maior quantificação, especialmente de organismos estressados.

Considerando que na literatura especializada é citado que a avaliação de amostras com baixo número de organismos coliformes é confundida pela presença de células que foram expostas a vários graus de stress, e que, aparentemente, essas células injuradas tornam-se sensíveis aos agentes inibitórios específicos presentes nos meios seletivos, tornando-se incapazes de crescer

e produzir colônias, o presente trabalho teve por objetivo, verificar o real significado da utilização dos meios de enriquecimento para recuperação e enumeração de coliformes, assim como, determinar a especificidade dos tratamentos em estudo para isolamento de *E. coli* de queijos frescais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Conceito de injúria celular

O problema da avaliação de alimentos contendo baixos números de organismos indicadores, têm sido apontado por vários autores, como consequência da presença de células que foram expostas a vários graus de stress e que, vêm provocar alterações no isolamento dos mesmos (5, 6, 26, 59, 60).

Discrepâncias na enumeração de colônias, segundo BISSO NETTE et alii (5), indicam que uma proporção substancial de células podem tornar-se fisiologicamente injuriadas devido ao stress ambiental imposto. Algumas pesquisas realizadas (37, 38, 66, 74), para avaliar o efeito da exposição ao frio, calor ou qualquer ambiente estressante, indicam que os microorganismos são afetados tornando-se debilitados, de tal modo que problemas significativos surgem para detecção e enumeração dos mesmos.

O conceito de injúria sub-letal foi primeiramente associado com a redução de organismos indicadores, quando foi obser-

vado que os dados de enumeração de coliformes em águas que continham resíduos tóxicos ou cloro, eram consistentemente mais altos pelo método NMP (número mais provável) do que pelo processo da membrana de filtro (MF), McFETERS et alii (40). O mesmo autor sugere, que a injúria pode subestimar o número de bactérias indicadoras podendo levar à avaliações incorretas.

A injúria sub-letal não é bem definida: MACKEY et alii (37), a consideram como sendo a incapacidade das células sobreviventes de crescerem em meios seletivos contendo sais biliares. Já para RAY & SPECK (56), a injúria foi determinada como a capacidade das células de formarem colônias em Trypticase Soy Agar (TSA) com extrato de leveduras, mas não em Violet Red Bile Agar (VRBA) e Desoxicolato Lactose Agar (DLA). BISSONETTE et alii (5), em concordância com os autores, observaram que quando as células bacterianas eram expostas ao ambiente aquático, uma proporção significativa, perdia sua habilidade para produzir colônias em um meio seletivo, embora ainda tivessem capacidade de recuperação em meio não seletivo, nutricionalmente rico.

Evidências, sugerem que celular injuriadas podem atingir mais que 40% da população bacteriana existente numa amostra, variando essa percentagem com o tempo e temperatura de estocagem, e com a natureza e pH do fluído em suspensão (9, 30, 58, 60, 70). Segundo McDONALD et alii (39), a injúria pode ser medida pela diferença nas contagens, quando células estressadas são simultâneamente enumeradas em meios seletivos e não seletivos. Assim, so-

mente células não injuriadas são detectadas em meios seletivos, enquanto que o meio não seletivo, é designado para recuperar ambas. Contudo, prosseguem esclarecendo, que os agentes letais às células injuriadas podem ser formados espontaneamente, quer em meio seletivo ou não.

## 2.2. Causas e agentes agravantes da injúria celular

Injúria celular ou metabólica têm sido normalmente relacionada com o efeito das temperaturas de processamento e estocagem de alimentos (4, 9, 19, 24, 45, 70). Conforme mencionado, a viabilidade de organismos danificados, é na maioria das vezes afetada acentuadamente pelas mudanças ambientais. A suposição de que condições ambientais semelhantes são satisfatórias para detecção e crescimento de bactérias que foram ou não submetidas ao tratamento térmico, tem sido questionada por diversos autores (4, 19, 24, 32).

De acordo com CLARK et alii (9), a injúria celular causada, pelo tratamento térmico é evidenciada por uma fase de latência prolongada, maiores exigências nutricionais, uma faixa de pH e temperatura mais restrita para crescimento, ou uma maior sensibilidade aos inibidores potenciais e agentes seletivos. Nelson, citado por BEUCHAT & LECHOWICK (4), afirma que bactérias submetidas a ação do calor são mais exigentes em seus requerimentos nos meios comuns de crescimento. Considerações adicionais são levadas

tadas por MAXCY (38) e IANDOLO & ORDAL (30), ao considerarem esses tratamentos como sendo responsáveis pelo aumento de requerimentos nutritivos para recuperação e redução da tolerância aos agentes seletivos em meios de cultivo. Os autores citam que essas exigências nutricionais para recuperação de células termo-injuriadas consistiriam geralmente de uma solução contendo uma fonte de energia, tal como a glicose, uma mistura de aminoácidos e fosfatos. IANDOLA & ORDAL (30) esclarecem que, embora uma fase de latência exagerada seja uma resposta cultural à injúria térmica, ela pode ser descrita mais acertadamente como um período de recuperação do stress.

Em experimentos conduzidos por MAXCY (38) com Violet Red Bile Agar (VRBA) e Agar Plate Count (PCA), para detecção de injúria em *E. coli*, foi observado, que com o aumento do tratamento térmico, houve uma redução na população total encontrada nas placas de VRBA quando comparadas às contagens com PCA. Estudo semelhante foram também realizados com leite e produtos lácteos, onde foi observado que culturas de *Staphylococcus aureus* e outros organismos componentes da flora láctes, demonstraram injúria subletal quando submetidos ao aquecimento GOFF et alii (24) e FIRSTENBERG et alii (19). FIRSTENBERG et alii (19), analisando o fenômeno de morte assim como injúria térmica na faixa de 50 - 75°C, observaram que culturas foram injuriadas tão logo iniciado o aquecimento, sendo que este choque térmico aumentava com a elevação da temperatura.

Poucas informações quantitativas tem sido avaliadas, em bora muitos trabalhos chamem à atenção para a sobrevivência de E. coli durante estocagem a frio (37, 39, 43, 74). Estocagem prolon gada sob condições de baixa temperatura são apontadas por MAXCY (38) como responsável pelo aumento da sensibilidade aos agentes inibitórios nos meios de recuperação e conseqüentemente aumento dos requerimentos nutricionais. Observando os efeitos de repeti dos congelamentos e descongelamentos, foi demonstrado que cada um desses processos era acompanhado por um aumento na injúria sub - letal.

O processo de injúria sub-letal durante a estocagem po de também depender, da natureza do substrato. MACKEY et alii (37) ressaltam que a alta sobrevivência de bactérias na carne, ao ser comparada com amostras de água mantidas à mesma temperatura de congelamento, foi presumivelmente porque a carne, como outros a limentos, contém substratos crioprotetores.

É interessante notar que coliformes injuriados em ali - mentos congelados não podem ser enumerados por meios seletivos comuns a menos que lhes seja permitido primariamente uma recupe - ração em meio não seletivo. Evidências similares são indicadas nos experimentos de Curran & Evans, reproduzidos por STRAKA & STO KES (70), ao considerarem que bactérias que sobreviveram à pro - cessos de destruição pelo frio estão em harmonia com o conceito de injúria metabólica pelo calor, irradiação ultravioleta e com - postos tóxicos são portanto mais exigentes nos seus requerimentos

nutritivos que células não expostas aos agentes físicos e químicos acima mencionados.

Células bacterianas experimentam injúria não-letal quando submetidas à concentração de NaCl, tornando-se assim impossibilitadas de recuperação em meios seletivos (30, 38, 42). GOFF et alii (24), observando a influência da concentração salina e tempo decrescente de exposição, concluíram que meios contendo NaCl são responsáveis pelo agravamento da injúria e morte celular. Entretanto quando esses dados foram coletados independentes do tempo de incubação, foi verificado que os referidos meios contendo NaCl apenas evitaram o reparo e crescimento subsequente.

### 2.3. Influência da temperatura do agar na recuperação de células injuriadas

Precauções e limitações no uso dos métodos padrões de incorporação para detecção e enumeração de organismos indicadores em alimentos são sugeridas por BISSONETTE et alii (6). Eles constataram que a temperatura do agar (45°C) pode contribuir para uma ineficiente recuperação de células, subestimando assim a densidade populacional presente na amostra. É comum atribuir-se à temperatura mencionada como principal fator interferente nas baixas enumerações das células viáveis pelo método de incorporação (6, 25, 26, 32, 50). RAY & SPECK (57, 59) e SPECK & READ JR. (66) tecem maiores considerações ao afirmarem que a manipulação

do método de incorporação condiciona uma baixa detecção de *E. coli* nos meios seletivos usuais.

Estudos anteriores realizados por Stapert, Sokolski & Northan e Zobell & Corn, transcritos por KLEIN & WU (32), enfatizam também o efeito da temperatura do agar nutritivo em reduzir a recuperação microbiana quando usado o método de incorporação. Segundo HARTMAN et alii (26) os efeitos do aquecimento do agar, fundido à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , acrescidos da presença de agentes inibitórios aumenta a inabilidade de células injuriadas de se recuperarem quando do procedimento convencional de plaqueamento em VRBA. Assim, ORDAL et alii (50), esclarecem que quando os procedimentos de incorporação são usados, as bactérias presentes podem ser submetidas ao stress pelo calor do agar fundido. KLEIN & WU (32), reportam que organismos heteropatogênicos em amostras de água, são susceptíveis à temperatura do agar usado nos métodos padrões de procedimento por incorporação, esclarecendo que aumentos significativos na enumeração de células são notados quando as técnicas de plaqueamento em superfície são usadas.

Além da temperatura do agar como fator inibitório da recuperação, é citado por HARTMAN et alii (26), a influência da preparação do VRBA, que quando preparado com brando aquecimento era verificada uma recuperação de 100% das células testadas, enquanto que o mesmo meio autoclavado fornecia uma média de apenas 24% de recuperação. Por outro lado, o plaqueamento com revestimento em superfície no meio mencionado quando esterilizado, tam-

bém resultou em baixa detecção, o que para os autores, vem demonstrar que a temperatura do meio de cultivo não foi a causa primária ou única, da baixa recuperação. A diferença de tempo entre o plaqueamento e adição do revestimento é também apontado como responsável pelo baixo rendimento.

RAY & SPECK (59) estudando várias modificações do método de plaqueamento com revestimento, tais como, tipos de métodos de revestimentos, meios utilizados, volume do meio por placa, concentração do meio, volume da amostra, tempo e temperatura de incubação das placas para permitir o reparo de células injuriadas antes do revestimento seletivo, concluíram que entre essas variáveis somente o tempo de pré-incubação e temperatura de incubação das placas antes do revestimento com VRBA foram importantes.

#### 2.4. Presença de agentes inibitórios nos meios seletivos

Agentes seletivos comumente adicionados aos meios utilizados para detecção e enumeração de microorganismos oriundos dos alimentos, são citados geralmente como sendo inibitórios ao reparo ou recuperação de bactérias estressadas (6, 29, 38, 50, 74). MAXCY (38) ressalta que estes meios contêm inibidores intencionais ao limite de crescimento de outros microorganismos que podem ainda serem antagônicos às células coliformes injuriadas.

Vários estudos indicam os sais biliares como sendo os constituintes antagônicos primários para recuperação de células

com lesões sub-letais (25, 45, 60, 66). Comentários feitos por MAXCY (38) em suas investigações realizadas para determinar a origem destes efeitos, leva-nos ao consenso que o antagonismo e as limitações associadas à recuperação, estão mais intimamente ligados a fenômenos físico-químicos do que à inibição da atividade superficial ou inibição biológica direta.

Coliformes que sofrem dano celular causado pela exposição a ácidos, são citados por HUSSONG et alii (29) como sendo, quase sempre, mais sensíveis aos agentes seletivos tais como, sais biliares e corantes. Verifica-se que estes organismos que foram estressados por ácidos falharam em produzir gás ou mesmo crescer em caldo Verde Brilhante Biles (BVB). Essa inibição é confirmada, pela alta concentração de sais biliares nos meios seletivos, ou devido à toxidez desses agentes às bactérias injuriadas (6, 45, 74).

McFETERS et alii (40) demonstraram que a densidade populacional de diferentes gêneros bacterianos não teve uma variação substancial, entre os diferentes gêneros em suas respostas aos componentes de 16 meios usados onde 11 continham desoxicolato e sais biliares. Entretanto enquanto as células não injuriadas foram virtualmente inafetadas pelas concentrações de desoxicolato inferiores a 0,1%, as células injuriadas foram severamente inibidas em todas as concentrações superiores a 0,01%. Estes resultados são confirmados por WARSECK, RAY & SPECK (74) ao verificarem que desoxicolato e lauril sulfato presentes nos meios seletivos

agem como inibidores potenciais de células injuriadas. A exposição das células injuriadas ao caldo Verde Brilhante Biles (BVB) e Lauril Sulfato Triptose (LST), impede a formação de colônias no TSA com extrato de levedura, sendo que quando essas células são submetidas previamente a um período de recuperação neste meio, recuperam e produzem colônias em VRBA e DLA, não são inibidas pelo BVB e LST, RAY & SPECK (56).

Destas observações MEHLMAN & ROMERO (41) levantam questões básicas sobre a efetividade dos métodos padrões na recuperação de biotipos patogênicos quando biotipos não patogênicos estão presentes, e se o processo de enriquecimento seletivo tem um efeito adverso sobre os plasmídeos que codificam traços de patogenicidade. Estas e outras questões têm sido intensamente investigadas, permanecendo entretanto lacunas que impedem uma avaliação imparcial dos resultados obtidos quando do uso dos meios seletivos no controle de qualidade e aplicação dos testes de sanidade em alimentos.

#### 2.5. Limitações do método do número mais provável (NMP)

A técnica do NMP adotada pela "United States of Food and Drug Administration and the American Public Health Association" para enumeração de coliformes, apresentam algumas desvantagens, quando comparadas ao Método de Contagem Direta (CD), uma vez que estas requerem um máximo de 48 horas de incubação em LST ou Cal-

do Lactosado (LC) a 35°C, seguido por um adicional de 24-48 horas de incubação em Caldo EC a 44,5 ou 45,5°C, HACKNEY et alii (25).

A validade da incubação em tubos NMP presuntivos que requerem 48 horas para tornarem-se positivos encontra respaldo em inúmeros estudos que defendem a necessidade de apenas 24 horas para que os tubos presuntivos sejam transferidos para meio *Escherichia coli* (EC) (25, 41, 49, 61). DEXTER (14) utilizando amostras de água do mar e mariscos observou que não houve diferença significativa entre o número de tubos positivos em meio EC após 24 e 48 horas do teste presuntivo, sendo de opinião que quando processos de tubos múltiplos para determinação do NMP de coliformes fecais forem usados, o teste presuntivo pode ser interrompido após 24 horas.

Entretanto existem controvérsias no sentido de que uma das desvantagens apresentadas pelo método é o fato de subestimar a densidade populacional, mesmo quando observadas as 48 horas de incubação. Padrões de recuperação desenvolvidos por OLSON (49) demonstraram que o método do NMP falhou na recuperação de números significativos de coliformes, decorrentes da presença de testes presuntivos negativos que tornavam-se positivos para coliformes fecais quando repicados em meios confirmativos. Estes testes foram designados pelo autor de falso-negativos, isto é, presença de crescimento nos tubos presuntivos sem produção de gás mas confirmativos para coliformes fecais. Outra desvantagem é ainda a-

crescentada por HACKNEY, RAY & SPECK (25) de que o método do NMP é refletido pela enumeração indireta, que o torna pouco preciso quando comparado ao método direto de plaqueamento, a menos que a densidade populacional seja elevada. Por outro lado, trata-se de um método laborioso e oneroso. Conduzindo a um consenso RAYMAN & ARIS (61) são de opinião que a enumeração de *E. coli* pelo método do NMP leva de 8 a 12 dias tornando-o um método cansativo, exigindo múltiplos conjuntos de tubos, diversidade de meios para plaqueamento, além de diversas manipulações. É interessante notar contudo, que embora estas e outras informações conduzam preferivelmente à aceitação do método de contagem direta, BISSONETTE et alii (6) ressaltam que a estatística baseada nos valores de NMP não são sempre representativas da densidade absoluta de uma atribuída amostra e pode ser sempre difícil para interpretar em comparação com resultados da contagem direta. RIBEIRO (63), citando Ray e Speck, esclarecem que devido a esse grande grau de variabilidade observado pelo uso dos meios líquidos no método do NMP, tem-se recentemente preferido o emprego dos meios sólidos com inoculação por incorporação e superfície.

#### 2.5.1. Presença de reações falso-negativas nos testes de número mais provável (NMP)

A presença de reações NMP falso-negativas têm sido associada ao impedimento ou não indução de hidrogeniase da enzima fôrmica em células injuriadas, que produz gás hidrogênio a par -

tir do ácido fórmico (5, 6, 49). A natureza dessa inibição pode explicar a ausência da produção de gás durante a etapa presuntiva dos testes. Contudo, o sistema enzimático parece ser recuperado, ou induzido, durante esta fase do teste, conduzindo à produção de gás nos testes subsequentes, OLSON (49). Explicações a d ic ion ais são acrescentadas por Hill, citado por OLSON (49), ao esclarecer que estes resultados podem ser devido à ação inibitória do Lauril Sulfato de Sódio, utilizado nos testes presuntivos, ou mesmo pela presença de microorganismos competitivos que afetam adversamente a produção de gás por coliformes injuriados.

Informações transcritas por RIBEIRO (63), reportam que quando a razão não coliformes/coliformes é alta, a produção de gás visível pode não ser observada prontamente mesmo que um número considerável de coliformes esteja presente na amostra. DEXTER (14), esclarece que quando completado ou não o tempo de 24-48 horas nos testes presuntivos, o padrão total de tempo aumenta significativamente o número de coliformes fecais positivos nos tubos que foram incorretamente considerados negativos. Dado a esses resultados dois valores para cada interação são sugeridos por OLSON (49) e MEHLMAN & ROMERO (41) onde um valor NMP é determinado a partir do número de células capazes de fermentarem o carboidrato e outro baseado no número total de células que produziram crescimento,

A presença de bactérias associadas às reações falso-negativas, foram estimadas por OLSON (49) onde mais de 50% dos iso

lados falso-negativos para coliformes-fecais foram de *E. coli*. Com relação às espécies coliformes responsáveis pelas reações falso-negativas nos testes presuntivos, o autor cita como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens* e *Klebsiella ozoniae*. Além dessas, em número mais limitado, foram identificadas *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter hafniae* e *Erwinia* sp.

#### 2.5.2. Presença de bactérias associadas com testes falso-positivos

As reações presuntivas falso-positivas são citadas em vários estudos (16, 28, 53, 55, 75) e atribuídas por HUSSONG et alii (29), à diversas causas como: presença de bactérias aeróbicas ou aeróbicas facultativas, formadoras de esporos, produtoras de gás, fermentação sinérgica da lactose por simbiontes produtoras de gás, ocorrência sazonal de organismos coliformes que sobreviveram ao processo de detecção empregado, antagonismo microbiano, e à presença de bactérias oxidase-positivas capazes de produzir gás a partir da lactose.

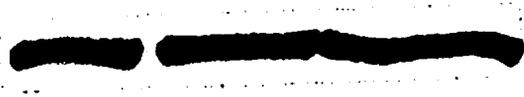
Reações falso-positivas são definidas por WEISS et alii (75) como sendo aquelas resultantes dos testes NMP com produção de gás que não isolaram *E. coli*. Para POWELL, MOORE & GOW (53), embora testes EC confirmativos detectem coliformes não-fecais, é presumível que culturas positivas em caldo EC possam conter uma alta proporção de *E. coli* típica biotipo I e II. Se *E. coli* não

são isolados de um tubo de fermentação positivo de caldo EC, é co mum descrever a cultura como falso-positiva (49, 53, 55, 75). A habitual formação de gás em meio EC confirmativo em temperaturas elevadas é concordantemente descrita por FISHBEIN & SURKIEWICE (22) como indicativo de biotipos I e II de *E. coli* típicas, mas que infelizmente *Enterobacter* e certas combinações de organismos sinérgicos, podem também produzir gás em meio EC confirmativo a temperaturas elevadas, sendo que a formação de gás sob essas con dições não é realmente um critério de fecalidade. Complementando, POWELL et alii (53) ponderam que embora uma alta incidência de culturas falso-positivas sejam relatadas por diversos estudos, não é prático o uso de futuros testes positivos, assim como Indol, Vermelho-metil, Vogler-Proskauer e Citrato (reações INViC), para confirmar a presença de *E. coli* em toda cultura de caldo EC.

A pouca especificidade dos testes confirmativos em EC para *E. coli* foi observada também por RAJ & LISTON (55) em algumas classes de alimentos. Eles detectaram que a partir de colônias isoladas selecionadas de placas contendo agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e subcultivadas em caldo EC, obtinha uma redução significativa do número de resultados falso-positivos. Procedimento similar foi realizado por POWELL et alii (53) mas a re dução de culturas falso-positivas foi insignificante. Segundo e les a alta incidência de culturas EC falso-positivas pode estar afetada pela interpretação do grau de gaseamento requerido antes que um tubo seja considerado positivo.

Em adição, RIBEIRO (63) informa que alguns pesquisadores consideram as temperaturas inferiores a 44°C como responsáveis pela produção de gás por outros tipos de coliformes. Considerações fundamentadas na fermentação de lactose em diferentes faixas de temperatura foram realizadas por FISHBEIN et alii (21) e FISHBEIN & SURKIEWICZ (22) ao compararem a incidência de falsos positivos em caldo EC a 44,5°C e a 45,5°C, esclarecendo que incubações de tubos EC/45,5°C a intervalos de 24 a 48 horas deram um crescimento adicional de 4,8% de *E. coli* recuperados, mas que este foi acompanhado por uma produção excessiva de falso-positivo, o que representou um decréscimo na seletividade da *E. coli*. Em vista desses resultados os autores sugerem que o tempo de incubação em banho-maria a 45,5°C para os testes EC seja limitado por 24 horas com o fim de assegurar uma ótima especificidade, ressaltando que a produtividade de um meio é também dependente do tempo. WEISS et alii (75) reforçam esses comentários mostrando que os valores de NMP variaram consideravelmente no período de 24 e 48 horas de produto para produto, onde as diferenças maiores para o NMP padrão indicam que relativamente maior volume de gás é produzido entre 24-48 horas nas culturas que mostraram crescimento somente após 24 horas. Conforme esses autores, se a formação de gás em temperaturas elevadas for tomada como único parâmetro indicador da presença de coliformes fecais, um tempo prolongado de incubação torna-se mais crítico.

POWELL et alii (53), informam que apenas 64% dos tubos gás positivos de caldo EC isolaram *E. coli* de amostras de carne



de caranguejo congelada, sendo que algumas das espécies coliformes não-fecais isoladas pertenciam ao gênero *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Serratia*. Admitem ainda que essas cepas foram naturalmente adaptadas ao crescimento a uma temperatura elevada, uma vez que a maioria foi hábil para crescimento a 44,5°C quando testadas em Caldo EC. De vários alimentos analisados por WEISS et alii (75) o leite contribuiu com a maior parte dos tubos falsos-positivos a 44,5°C (20%) em comparação com a temperatura de incubação a 45,5°C (8%). Segundo os autores esta elevação no percentual de tubos falsos-positivos foi refletida na baixa recuperação de *E. coli* a esta temperatura (44,5°C).

Searo & Putman, e Leitch, citados por HUSSONG et alii (28, 29) mostraram que dois diferentes organismos que independentemente foram incapazes de fermentação aerogênica de lactose, produziram gás quando cultivadas em culturas mistas em caldo Lactosado (LC). Esses autores denominaram este processo de fermentação simbiótica da lactose. De acordo com o referido autor o meio LST tem sido usado cada vez mais, e se tornou um meio de escolha para reduzir a incidência de reações falso-positivas. Contudo, ponderam ainda que esta modificação promissora exige interpretação discreta, visto que os coliformes debilitados, embora recuperáveis em meios seletivos, podem não produzir gás ou serem irre recuperáveis nestes mesmos meios. Assim, quando o meio LST é usado, reações falso-negativas ao invés de falso-positivas podem ser de interesse.

2.5.3. Associação do aparecimento de brilho metálico característico em placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) com testes falso-positivos

A interpretação de resultados considerando o aparecimento de brilho metálico das colônias em placas de EMB, como característica de confirmação de *E. coli* foi observada por RAJ & LISTON (55). Eles esclarecem que a produção de brilho metálico não é um critério real da presença desses organismos, visto que colônias de *E. coli* típicas podem perder seu brilho metálico característico após 24 horas ou, quando estocadas em refrigerador. Verificaram ainda que o subcultivo de colônias mostrando brilho metálico em placas EMB transferidas para caldo EC, eliminavam acima de 70% dos resultados falso-positivos precedentes.

O problema da diferenciação de organismos coliformes a través da observação de colônias típicas é também associado com as formulações do m-Endo-agar, utilizado na técnica de Membrana de Filtro (MF), considerando existir uma inabilidade para distinguir organismos coliformes de coliformes não fecais, uma vez que a diferenciação de coliformes de outras bactérias é realizada pela produção de uma colônia escura com um brilho verde metálico característico. De acordo com LeCHEVALLIER et alii (33) cerca de 25% das colônias com fundo não brilhante em m-Endo-agar, produziram gás em caldo lactosado e foram identificadas como espécies *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. Assim, a o

corrência de coliformes falso-negativos em m-Endo agar são também lastimáveis, desde que esses organismos não puderam ser interpretados como uma indicação potencial de contaminação, possivelmente devido à presença de coliformes injuriados que não cresceram ou falharam em produzir colônias típicas neste meio.

## 2.6. Manifestações de injúria celular

As várias manifestações prejudiciais da injúria celular são descritas por RAY & SPECK (60) como sendo: permeabilidade da membrana celular; atividade de certas enzimas; degradação de ribossomos e aumento da sensibilidade a vários agentes seletivos.

De acordo com MOSSEL et alii (46), as células bacterianas que foram sub-letalmente estressadas por vários tratamentos físicos ou químicos, mostram normalmente um aumento da permeabilidade da parede celular, uma redução dos componentes celulares essenciais, assim como RNA e inativação enzimática. Por conseguinte, isto conduzirá a um aumento da sensibilidade celular aos vários agentes antimicrobianos usados em meios seletivos, com consequente perda da habilidade para formar colônias pela bactéria injuriada.

RAY & SPECK (60) enfatizam que a redução da barreira de permeabilidade permite o vazamento de componentes celulares, tais como: proteínas, peptídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos,

possibilitando também a entrada de vários íons do meio para dentro das células. Essas mudanças na integridade da parede celular, as quais facilitam o vazamento de vários componentes essenciais, têm sido supostas serem a causa principal da injúria e subsequente morte das bactérias gram-negativas (4, 30, 46, 60).

A perda de material semelhante ao RNA e de aminoácidos livres pela célula durante o aquecimento sub-letal é sugerida por IANDOLO & ORDAL (30) como ocorrência de modificação na barreira de permeabilidade celular. Esse escoamento do RNA das células é julgado por BEUCHAT & LECHOWICH (4) ser parcialmente responsável pela morte dos organismos tratados pelo calor, sugerindo que o aquecimento induz a degradação do RNA no interior das células antes de ocorrer a vazão, ou ainda que o RNA seria hidrolisado enzimaticamente após sair da célula. BEUCHAT & LECHOWICH (4) citam que uma fase de latência prolongada e perda da capacidade de recuperação em meio contendo 7,5% de NaCl por células injuriadas é descrita por Sogin & Ordal, citados por BEUCHAT & LECHOWICH (4). Esta ocorre parcialmente devido à mudanças na membrana celular, que permitem a liberação de componentes solúveis.

## 2.7. Recuperação de injúria celular

A injúria é considerada reversível por RAY & SPECK (60) uma vez que as células injuriadas são capazes de recuperação quando expostas a um meio apropriado. Por outro lado, o grau de stress

e a alteração no comportamento das células podem ser observados durante a recuperação em meios testes. Entretanto, segundo MOSSEL et alii (46), é necessário verificar se aqueles meios considerados recuperativos de células debilitadas não é na realidade, um meio de multiplicação de células não injuriadas ou de células as quais foram separadas rapidamente. Controvérsias concernentes à recuperação celular têm sido discutidas sem contudo obter uma solução definida. MOSSEL et alii (46) prosseguem esclarecendo que um problema adicional encontra-se relacionado com que nem sempre a recuperação celular pode ser completada dentro de um período demorado, permitindo a ocorrência de pequena multiplicação por células não-lesadas. Concluem finalmente, que um segundo tipo de dados são também requeridos na avaliação de reparo quando o método de ressuscitação em meio sólido é efetuado.

CLARK et alii (9), afirmam que sob condições adequadas, uma célula injuriada pode se recuperar sem crescimento e torna-se indistinguível de uma célula não tratada. Alguns trabalhos ao longo dessa linha confirmam a possibilidade da recuperação celular antes de iniciar-se a multiplicação de outras células (9, 37, 40, 45, 57, 58). WARSEK, RAY & SPECK (74) relatam que a multiplicação celular não foi evidente entre 90 a 120 min. a 25°C, enfatizando que a recuperação da injúria precede suficientemente em um rápido grau ao início da multiplicação celular de maneira a garantir a recuperação de microorganismos injuriados. Entretanto MILBAUER & GROSSOWICZ (42) questionam a validade da recuperação de células injuriadas, afirmando que o crescimento obtido quando bai

as concentrações de cloro foram usadas em seus experimentos, foi devido à multiplicação dos sobreviventes ao invés da reativação celular.

Todavia, vários pesquisadores têm demonstrado que as células injuriadas possuem capacidade de regeneração através do processo de reparo celular, tornando-se fisiologicamente ativas capazes de desenvolverem-se em meios seletivos comuns. Posteriormente, conhecimentos do mecanismo e limitações da recuperação conduziram a métodos improvisados de detecção de reparo. Durante a recuperação as células tornam-se mais exigentes e seus requerimentos nutricionais encontram-se elevados, sendo que MOSS & SPECK (45) e RAY & SPECK (60) citam que certos peptídeos de cadeia curta e alguns aminoácidos são capazes de promover a recuperação da injúria.

A utilização de agar nutritivo como meio de recuperação vêm sendo evidenciada. Parece entretanto que a adição de peptona ou extrato de levedura ao agar mínimo também intensifica o grau de reativação celular. MILBAUER & GROSSOWICZ (42) estudando o efeito reativante do agar nutritivo para estabelecer quais os ingredientes responsáveis pela intensificação da taxa de sobrevivência, verificaram que tanto a adição de peptona como extrato de levedura ao agar mínimo aumentou a número de sobreviventes, sendo que a mais alta reativação celular ocorreu com a suplementação com extrato de levedura. Ressaltam ainda que essas contagens foram intensificadas quando realizadas as adições des-

ses ingredientes em agar nutritivo. A adição de peptona ou sólidos do leite aos diluentes à baixa temperatura (4°C) é apontado por McFETERS et alii (40) por maximizarem a recuperação de células injuriadas, principalmente por demonstrarem pouco efeito sob as células não danificadas.

#### 2.7.1. Processo de reparo celular

Os fatores importantes na reativação encontrados no agar nutritivo suplementado ou não, podem exercer sua ação neutralizando o agente agressor (cloro, NaCl, etc.) ligado à célula, fornecendo metabólitos pré-formados essenciais para recuperação das injúrias celulares. Certos componentes simples são também mencionados por facilitarem o reparo de injúria metabólica de *E. coli* (45, 59, 70). A eficiência da enumeração das suspensões de *E. coli*, injuriadas ou não, foram avaliadas por McFETERS et alii (40) ao observarem o efeito dos diluentes na injúria não-letal. A diluição das amostras são geralmente exigidas, sendo que os diluentes normalmente recomendados são os fosfatos ou água com 0,1 % de peptona ou lactose (1, 3, 12, 13, 43, 67, 72). De acordo com McFETERS et alii (40) os organismos injuriados quando submetidos à diferentes diluentes a 24°C, variam amplamente na sua eficiência de recuperação durante o período de 90 minutos.

A Triptícase foi mostrada por MOSS & SPECK (45) ser o componente no TSA responsável pela recuperação de injúria sub-le

tal. Segundo os autores, esse ingrediente contém cinco peptídeos que proporcionam a maior atividade biológica necessária ao reparo da injúria. A função dos peptídeos na recuperação das células todavia não está definida.

A recuperação em Trypticase Soy Agar (TSA) e Trypticase Soy Broth (TSB) foi determinada por IANDOLO & ORDAL (30) usando várias temperaturas de incubação e valores de pH. Foi observado que a temperatura mínima de recuperação ocorreu de 3 a 7°C e a medida que esta era aumentada (30 - 37°C) obtinha-se uma rápida ascensão na taxa de recuperação, onde o máximo era alcançado à 37°C. Com relação à ação do TSA e TSB como meio nutritivo de recuperação os autores citam que a mesma envolve a atividade enzimática dirigida ao processo de reparo celular, ressaltando que a constância das contagens indicam que a recuperação não é dependente da multiplicação celular.

A recuperação de células injuriadas em TSA é devida a atividade da tripticase, considerado por STRAKA & STOKES (70) como um digestor enzimático de caseína. Outros digestores similares foram também apontados como agentes ativos de reparo de injúria metabólica porém a caseína ácida hidrolizada foi inativa. Por outro lado, peptídeos podem ser substâncias ativas na digestão enzimática da caseína e serem requeridas por células injuriadas para ressíntese de proteínas essenciais desnaturadas em temperaturas abaixo de zero, (30, 70). Ao que parece o enfraquecimento da membrana celular com uma perda parcial de seus componentes, du -

rante o dano ocasionado pelo processamento ou adição de agentes agressores ao alimento, ocasiona simultaneamente a degradação do RNA tornando-o capaz de escoar através da membrana enfraquecida. Para que ocorra a recuperação, esses materiais devem ser ressin-  
tetizados e reconcentrados além de promover a re<sup>in</sup>tegração da mem-  
brana.

Alguns trabalhos têm relacionado a susceptibilidade da célula à injúria ambiental com a fase de crescimento microbiano. Estudos realizados por MACKEY et alii (37) resultados indicam que as células em fase de latência foram mais susceptíveis à lesão sub-letal do que aquelas na fase estacionária de crescimento, evidenciando também um aumento nesta fase durante o processo de reparo. Estudos comparativos realizados por GILLILAND et alii (23) com organismos psicrófilos confirmam que esses estendem sua fase de latência no período de recuperação de injúria.

Geralmente, segundo CLARK et alii (9), à medida que o meio de enriquecimento torna-se mais seletivo pela adição de ingredientes adicionais, o tempo de latência ou de recuperação é prolongado. Estas e outras informações conduzem ao consenso de que durante esta fase prolongada, ocorre o reajustamento na forma de reparo celular.

#### 2.7.2. Período de reparo (pré-enriquecimento)

Para que a recuperação de células metabolicamente inju

riadas possa ocorrer antes que sejam expostas aos agentes seletivos inibitórios que impedem o reparo e subsequente proliferação dos organismos, diversos autores sugerem que um período de reinteração em meio não seletivo nutricionalmente rico, seja fornecido com o fim de permitir a recuperação de injúria, resultando assim num aumento de detecção e enumeração de organismos indicadores (6, 20, 26, 50, 56, 62, 66).

ORDAL et alii (50) evidenciam que o valor de um período de reparo anterior à tentativa para quantificar um patógeno oriundo de alimentos, foi primeiramente reconhecido por North, ao usar a lactose como caldo não seletivo ou de pré-enriquecimento, anterior ao enriquecimento seletivo em Selenite Cystine ou Caldo Tetracionato, na detecção de *Salmonella* em produtos de ovo dessecado. O sucesso deste método é corretamente atribuído à restauração de um grande número de células para um estado de crescimento ativo após um período de latência ou stress causado pelo processamento.

Dos três métodos comumente usados para enumeração de coliformes e coliformes fecais (plaqueamento por incorporação e superfície, NMP e membrana de filtro) várias modificações foram propostas para melhorar a detecção e enumeração pelo processo de reparo através de meios não seletivos (20, 48, 59, 61, 66).

No procedimento de plaqueamento por incorporação e superfície, a recuperação com meio não-seletivo tem sido proposta

pelo uso de TSA (9, 26, 30, 45, 60, 74) ou modificações destes, suplementado com 0,3% de extrato de levedura e 0,5% de glicose (6, 57, 60), seguido de um período de incubação para reparo variável entre 15 minutos a 2 horas após o qual 5 ml do meio seletivo com posterior incubação a 35°C por 24 horas antes da contagem é sugerido (6, 38, 66, 74). O VRBA e DLA são normalmente aconselhados como meios sólidos seletivos para revestimento das placas (6, 26, 38, 66).

HACKNEY et alii (25), sugerem que dentre os métodos usuais para reparo e detecção da densidade populacional de coliformes e coliformes fecais, o plaqueamento por incorporação usando TSA, seguido por 1 a 2 horas de incubação para efeito de reparo, com subsequente revestimento com VRBA, mostrou ser um método mais eficaz do que o método do NMP padrão, além de permitir a enumeração de células injuriadas, as quais poderiam permanecer subdetectadas. RAY & SPECK (59) esclarecem que os componentes seletivos existentes no VRBA misturam-se completamente ao TSA criando um meio no qual ambos repararão os coliformes injuriados, possibilitando assim a multiplicação e formação de colônias típicas. Além disso, WARSECK et alii (74) acrescentam que durante o método de plaqueamento com revestimento em superfície, é menos restrito o dano celular justificando assim o seu uso acima do método de incorporação padrão, para melhor detecção e enumeração de células.

Outro método de recuperação através do emprego de meios

sólidos não seletivos foi sugerido por SPECK & READ (66) consistindo de plaqueamento difuso em superfície em placas com TSA incubados por uma a duas horas a 25°C com subsequente revestimento com VRBA. Do mesmo modo HARTMAN et alii (26) utilizando o método de reparação por meio sólido, propõem o plaqueamento em superfície de amostras de alimentos contendo coliformes injuriados em VRBA elaborado sem os sais biliares e corantes seletivos. Este método é acompanhado por um revestimento das placas com VRBA contendo dupla concentração de sais biliares, vermelho neutro e cristal de violeta (VRB - 2 - agar). O referido método foi também testado por REBER & MARSHALL (62) num estudo comparativo onde o VRB-2 agar foi consideravelmente mais produtivo que o VRBA para os testes de leite cru, sorvete e queijo "cottage".

A exposição de uma população de células injuriadas a caldo não-seletivo é citada por BISSONETTE et alii (5) como capaz de aumentar a proporção de células capazes de recuperarem-se de modo a tornarem-se insensíveis aos agentes inibitórios em meios seletivos. Procedimentos para detecção de reparo usando meios líquidos não seletivos (métodos do NMP), envolve geralmente três caldos diferentes. O caldo nutritivo não-seletivo mais constante é o TSB com ou sem suplementação de extrato de levedura - TSYB (25, 37, 46, 60, 74).

WARSECK et alii (74), usando informações derivadas de estudos realizados por SPECK & READ (66), sugerem um método de reparo e enumeração de coliformes injuriados através da incuba -

ção em TSB por uma hora a 25°C. Por outro lado, ORDAL et alii (50), atribuem um aumento de vinte vezes na contagem de coliformes em algumas amostras de alimentos quando submetidos à pré-incubação em TSB.

RAY & SPECK (56, 60) reportam que pelo menos 90% das células injuriadas recuperaram-se e iniciaram multiplicação após duas horas de incubação em TSYB a 25°C. O grau de reparo quando da utilização do meio modificado, foi considerado rápido e máximo. Nesses estudos os autores concluíram que a restauração das bactérias coliformes injuriadas deveria ser realizada antes que tais células fossem expostas ao meio seletivo de enumeração.

Um período de pré-incubação para reparo celular entre uma a duas horas em banho-maria a 25°C é sugerida pela maioria dos autores (5, 26, 50, 56). Para MACKEY et alii (37) a restauração da injúria em meios líquidos não seletivos ocorreu entre duas e seis horas e foi quase sempre acompanhada por um aumento na contagem viável total. Os caldos seletivos mais usados têm sido o caldo lactosado (LC), caldo Verde Brilhante Biles (BVB) e Lauril Sulfato Triptose (LST), contendo tubos de fermentação num total de 3 a 5 tubos em cada das 5 a 10 diluições decimais sucessivas, seguindo-se um período de incubação a 35°C por 24-48 horas (6, 37, 56, 60, 74).

Uma proposta prática para determinar o grau de reparo, é sugerida por MACKEY et alii (37) quando as contagens em meio se

letivo são designadas "contagem real" e o crescimento simultâneo aumentado pelo método de detecção e reparo reconhecido como detecção de células injuriadas. Assim a contagem real é tomada como a contagem inicial em meio não seletivo e o reparo é representado pela diferença decrescente entre este e a contagem em meio seletivo.

O processo de detecção e reparo proposto por SPECK & READ (66) têm-se mostrado eficiente, permitindo que organismos injuriados se recuperem em um pequeno volume de meio não seletivo. Assim, um período de enriquecimento apresenta-se como um meio não tóxico de ajustamento gradual e recuperação celular, envolvendo tempo e temperatura de reparo, antes que essas bactérias sejam expostas ao meio seletivo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Um total de quinze amostras de queijo tipo Minas Frescal foram obtidas em feiras livres no Município de Lavras - MG e analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, no período de maio a dezembro de 1982, para enumeração de coliformes e coliformes fecais, utilizando técnicas previamente selecionadas por RIBEIRO (63).

Foram utilizadas técnicas de NMP (Número Mais Provável) em caldos e CDP (Contagem Direta em Placas), em agar, acrescidas de pré-enriquecimento para recuperação de células lesadas, conforme discriminadas nos Quadros 1 e 2.

QUADRO 1. Técnicas utilizadas para isolamento de coliformes totais e fecais com o uso de pré-enriquecimento

Pré-enriquecimento	Incubação		Método de repicagem	Incubação		Método de repicagem	Incubação	
	°C	(h)		°C	(h)		°C	(h)
TSB	25	1	LST-BVB	35±1	24-48	EC	45,5±0,2	24-48
							45,5±0,2	24-48
TSA	35	2	VRBA	35	24	CTABL	43,0±0,5	24-48

TSB = Trypticase Soy Broth; TSA = Trypticase Soy Agar; LST = Lauryl Sulfato Tryptone; BVB = Caldo Verde Brilhante Bile; VRBA = Violet Red Bile Agar; EC = Caldo EC; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose.

QUADRO 2. Técnicas utilizadas para isolamento de coliformes totais e fecais pelos métodos padrões

Meio de cultivo	Incubação		Meio de repicagem	Incubação	
	°C	(h)		°C	(h)
LST-BVB	35 ± 1	24 - 48	EC	44,5 ± 0,2	24 - 48
				45,5 ± 0,2	24 - 48
VRBA	35	24	CTABL	43,0 ± 0,5	24 - 48

LST = Lauryl Sulfato Tryptose; BVB = Caldo Verde Brilhante Bile; VRBA = Violet Red Bile Agar; EC = Caldo EC; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose.

### 3.2. Preparo da amostra

Dois tratamentos foram dados às amostras:

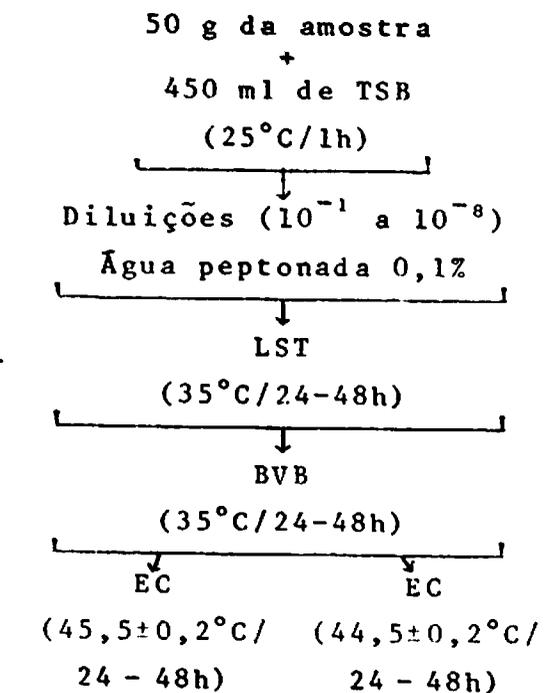
Foram pesadas 50 g da amostra e adicionadas à 450 ml de água peptonada a 0,1%, homogeneizadas em liquidificador estéril, sendo feitas posteriormente diluições decimais. Este processo foi utilizado para determinação do NMP sem pré-enriquecimento, como também para inoculação por incorporação dos meios sólidos, onde era feito o enriquecimento por TSA (Trypticase Soy Agar) segundo SPECK & READ (66) no próprio plaqueamento. As amostras repicadas em caldos (NMP) foram pré-enriquecidas com 450 ml de TSB (Trypticase Soy Broth) acrescidos de 50 g da amostra, homogeneizados, incubados à 25°C por uma hora, SPECK & READ (66) e diluídas para análises posteriores, Figura 1.

### 3.3. Método de repicagem e interpretação dos dados

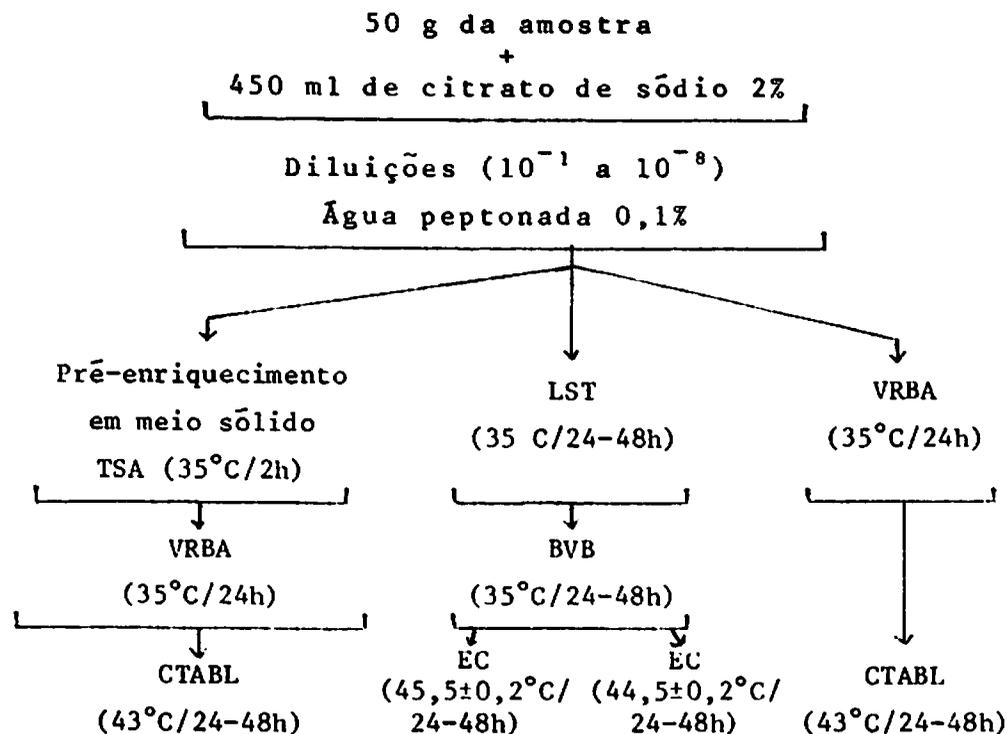
A enumeração pelo uso de meios líquidos foi realizada a partir da mistura da amostra em Trypticase Soy Broth (TSB), que foram repicadas em Caldo Lauryl Sulfato Triptone (LST) e Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB) observando-se tratamento se quencial do método padrão (2, 3, 15).

O pré-enriquecimento através de meio sólido foi realizado a partir da mistura com solução tamponada de peptona a 0,1%, tomando-se 1 ml das diluições seriadas e inoculadas em Agar Tryp

Pré-enriquecimento em meio líquido



Técnica padrão



Todos os tubos positivos repicados em EMB (35°C/24h)

Isolamento colônias puras repicadas em  
agar padrão inclinado (37°C/24h);  
coloração de Gram e provas bioquímicas

LST = Lauryl Sulfato Triptose; EC = Caldo *Escherichia coli*; TSB = Trypticase Soy Broth; TSA = Trypticase Soy Agar; VRBA = Violet Red Bile Agar; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose; EMB = Eosina Metil Bile Agar.

FIGURA 1. Preparo e tratamento das amostras

ticase Soy (TSA) por incorporação e incubação à 35°C por duas horas para permitir a recuperação de células injuriadas. Após incubação, foram adicionados 5 ml de Violet Red Bile Agar (VRBA). Seguiu-se procedimento idêntico à técnica padrão de enumeração e identificação em meios sólidos.

O número mais provável (NMP) foi estimado pela série de três tubos, considerando-se aqueles que apresentavam crescimento e produção de gás em tubos de Caldo Lauryl Sulfato Tryptone e confirmados em CLBVB, para enumeração de coliformes totais, e produção de gás em 24-48 horas quando confirmados em meio EC para coliformes fecais, THATCHER & CLARK (71), NICKERSON & SINSKEY (47). A contagem direta foi feita em placas, sendo selecionadas aquelas que apresentaram de 30 a 300 colônias típicas ligeiramente elevadas, com 2-3 mm de diâmetro, topo plano ou côncavo, centros escuros e um brilho metálico esverdeado, SHARF (65), ou colônias escuras ou de centro escuro com periferia transparente, nucleadas, com ou sem brilho metálico, THATCHER & CLARK (71).

Colônias selecionadas em VRBA e transferidas para CTABL, eram confirmadas como *E. coli*, quando produziam turvação e gás em temperatura de 43°C, conforme descrito por SHARF (65).

#### 3.4. Isolamento e provas bioquímicas

Todos os tubos considerados positivos e utilizados para cálculo do NMP, foram repicados em Agar Eosina Azul de Metile

no, pelo processo de estrias. Após incubação a 35°C por 24 horas eram selecionadas de 3 a 5 colônias que apresentassem características típicas do grupo coliforme no meio isolado (11). Também, a partir dos tubos de Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose (CTABL) com turvação e formação de gás foi feito plaqueamento para posterior isolamento de colônias (12, 65, 72).

Após incubação das placas as colônias selecionadas eram transferidas para tubos contendo Agar Padrão inclinado, incubados à 35°C por 24 horas para verificação do grau de pureza e posterior identificação.

A identificação foi realizada pelo método clássico iniciando-se pela coloração de gram e testes de citocromooxidase e posteriores provas bioquímicas.

Foram feitas as seguintes provas bioquímicas: lisina, ornitina, ureia, triptofano desaminase, dulcitol, malonato, fenilalanina, indol, vermelho de metila, Vogues-Proskauer, citrato e outras provas complementares quando necessárias (7, 10, 36, 43, 51, 69). Triple Sugar Iron Agar (TSI) foi usado como meio de triagem para Enterobactérias. Identificação de biotipos de *E. coli* fecais foi realizada com base nos testes INViC típicos (++--, -+--),

### 3.5. Tratamento estatístico

Para verificar a significância dos dados em relação ao uso do pré-enriquecimento dos coliformes totais e fecais, foi utilizada uma análise estatística através dos Testes de Friedman e Comparações Múltiplas conforme CAMPOS (8).

Os dados referentes à seletividade dos meios foram discutidos através de cálculos percentuais.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Coliformes totais e fecais

Na fase de investigação descrita neste trabalho, contagens comparativas de bactérias coliformes foram realizadas utilizando meios sólidos e líquidos não seletivos para detecção de reparo celular acompanhados de repicagem em meios seletivos descritos nas técnicas usuais de detecção e enumeração de organismos coliformes.

O estudo sobre a recuperação de organismos coliformes e coliformes fecais isolados de amostras de queijo tipo Minas Frescal, mostrou algum grau de reparo de células injuriadas quando comparadas as técnicas usuais com técnicas de pré-enriquecimento (Tabela 1 e 2). Observa-se a partir dos testes presuntivos para determinação de coliformes totais, os quais atuam geralmente como enriquecimento seletivo, que o uso de meios líquidos quando comparados aos meios sólidos, forneceram menor enumeração, fazendo supor que a utilização dos mesmos subestimam a detecção desses organismos.

[REDACTED]

TABELA 1. Valores médios de enumeração de coliformes totais após 48 horas de incubação em um meio líquido (NMP) e 24 horas em um meio sólido (CDP)\*

Meios utilizados		Coliformes totais	NMP modificado
Enriquecimento	Presuntivo confirmativo		
		———— colonias/g ————	
TSB	LST/BVB	2,30 . 10 <sup>7</sup>	2,35 . 10 <sup>7</sup>
-	LST/BVB	1,46 - 10 <sup>7</sup>	1,50 . 10 <sup>7</sup>
TSA	VRBA	2,60 . 10 <sup>7</sup>	-
-	VRBA	1,90 . 10 <sup>7</sup>	-

NMP = Número Mais Provável; TSB = Trypticase Soy Broth; TSA = Trypticase Soy Agar; BVB = Bile Verde Brilhante; CDP = Contagem Direta de Placas; LST = Lauryl Sulfato Triptose; VRBA = Violet Red Bile Agar.

\* Foram usadas 15 unidades de queijos frescos considerados cada um como uma repetição.

Evidências existentes sugerem que geralmente o plaqueamento fornece maior reprodutividade na recuperação de coliformes do que o método do NMP (17, 25, 50, 74). Entretanto, BISSONETTE et alii (6) esclarecem que, devido ao grande grau de variabilidade observado no uso dos meios líquidos, certa precaução é aconselhável quanto à comparação entre os resultados obtidos através do NMP e da contagem direta (CDP), devido ao estabelecimento de tendências nos índices de NMP por tratar-se de um método indireto de

avaliação. Concomitantemente, OLSON (49) em seus estudos mostrou que os testes presuntivos falso-negativos pelo método NMP subestimam a densidade populacional presente nas amostras analisadas, sugerindo a modificação do método com a inclusão de tubos falso-negativos em meios confirmativos para coliformes fecais.

TABELA 2. Valores médios de contaminação fecal obtidos através de diferentes técnicas de enumeração do grupo coliformes fecais\*

Técnicas	Meios utilizados		Confirmativo	°C	Coliformes fecais (colonias/g)
	Enriq.	Presuntivo			
1	TSB	LST-BVB	EC	45,5	2,0 . 10 <sup>7</sup>
2		LST-BVB	EC	45,5	1,2 . 10 <sup>7</sup>
3	TSB	LST-BVB	EC	44,5	2,1 . 10 <sup>7</sup>
4		LST-BVB	EC	44,5	1,3 . 10 <sup>7</sup>
5	TSA	VRBA	CTABL	43,0	2,5 . 10 <sup>7</sup>
6		VRBA	CTABL	43,0	1,7 . 10 <sup>7</sup>

TSB = Trypticase Soy Broth; TSA = Trypticase Soy Agar; EC = Caldo EC; LST = Lauryl Sulfato Triptose; BVB = Bile Verde Brilhante; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico e Lactose.

\* Foram utilizadas 15 unidades de queijo frescal consideradas cada uma como uma repetição.

Tentativas para obter uma melhor enumeração de organismos coliformes, foram realizadas neste trabalho observando a modificação proposta por OLSON (49) para o método de NMP. Como po

de ser observado na Tabela 1, a transferência de tubos presuntivos que apresentaram crescimento sem produção de gás, após 48 horas de incubação a 35°C, para meios confirmativos de coliformes fecais, não apresentou diferença significativa, como comprovado pelo autor em amostras marinhas. Estes dados, contudo, encontram-se em conformidade com aqueles apresentados por DEXTER (14).

O método TSA/VRBA recuperou cerca de 30,8% mais células que o método de incorporação padrão (Tabela 1). Segundo HACKNEY, RAY & SPECK (25), a baixa contagem em VRBA (a 35 ou 45°C) quando comparada às contagens em TSA/VRBA, indicam a presença de células injuriadas na amostra. A concordância entre esses e outros autores e os resultados obtidos, sustenta a validade dos dados registrados. Por outro lado, as contagens obtidas pelo método de detecção e reparo com TSB e TSA foram similares indicando que células injuriadas foram recuperadas por estes métodos, embora algumas vezes as contagens em TSA tenham sido mais elevadas.

O uso do método de detecção e reparo pelo TSA, com revestimento de 5 ml de VRBA após incubação à 35°C por duas horas, fornece um ligeiro aumento nas contagens totais, com subsequente confirmação de elevação da densidade populacional de coliformes fecais e isolamento de *E. coli* em caldo CTABL (Tabelas 1, 2 e 3). Os testes de Friedman e comparações múltiplas, conforme CAMPOS (8), foram usados para localizar as diferenças entre os tratamentos utilizados. Contudo, a partir destes não foram verificadas diferenças significativas na utilização das técnicas de pré-enri

quecimento para coliformes totais e fecais a níveis inferiores a 20% de probabilidade, apresentando um nível significativo apenas a 25%. Vale ressaltar que devido a grande variabilidade na densidade populacional das amostras ( $10^2$  a  $10^8$ ) as médias obtidas produziram freqüentes oscilações que dificultaram as comparações estimadas através dos testes estatísticos embora sejam detectados percentuais de 33,3%, 38,0% e 40% de recuperação celular pelo uso das técnicas CTABL/ 43°C, EC/44,5°C e EC/45°C respectivamente para coliformes fecais.

#### 4.2. Isolamento e enumeração de *Escherichia coli*

A estimativa do NMP para *E. coli* (Tabela 3) mostrou acima de tudo uma tendência a valores mais baixos com o aumento da temperatura de 43°C para 44,5°C e 45,5°C, concordando com os resultados obtidos por WEISS et alii (75) com amostras de água de esgoto, leite cru e carne. Estes autores comentam que esta tendência de valores de NMP inferiores com o aumento da temperatura de incubação foi maior quando somente a produção de gás foi considerada, fato também comprovado neste trabalho. MAXCY (38) também admite nas suas investigações uma redução na população total pelo aumento do tratamento térmico. Também, WEISS et alii (75), observaram que o efeito do tempo de duração da incubação (24 e 48 horas) na proporção de *E. coli* por coliformes fecais foi mais pronunciado a 45,5°C, o que não foi registrado em nossos estudos. DEXTER (14) é de opinião que provavelmente o mascaramento de cresci

mento de coliformes fecais e produção de gás na leitura de 24 horas resultou da presença de organismos competitivos. Alguns trabalhos ao longo dessa linha evidenciam o caráter competitivo de organismos coliformes com relação ao binômio tempo x temperatura. FISHBEIN et alii (21) e FISHBEIN & SURKIEWICK (22) mostraram que embora o índice de coliformes fecais cresça ligeiramente a 44,5 e 45,4°C a seletividade decresce com o tempo de incubação, originando a presença de reações falso-positivas para *E. coli*.

TABELA 3. Valores médios de coliformes fecais e *E. coli* obtidos através de diferentes técnicas de enumeração de coliformes fecais

Técnica*	Temperatura °C	Total de coli formes fecais (NMP)	Total de <i>E. coli</i> ** (NMP)	Percentual de produtividade de <i>E. coli</i> ***
1	45,5	2,0 . 10 <sup>7</sup>	3,7 . 10 <sup>6</sup>	18,5
2	45,5	1,2 . 10 <sup>7</sup>	4,3 . 10 <sup>6</sup>	35,8
3	44,5	2,1 . 10 <sup>7</sup>	3,6 . 10 <sup>6</sup>	17,8
4	44,5	1,3 . 10 <sup>7</sup>	3,8 . 10 <sup>6</sup>	27,7
5	43,0	2,5 . 10 <sup>7</sup>	1,0 . 10 <sup>7</sup>	40,0
6	43,0	1,7 . 10 <sup>7</sup>	5,8 . 10 <sup>6</sup>	34,1

\* Técnicas de números 1, 3 e 5 com pré-enriquecimento.  
Técnicas de números 2, 4 e 6 sem pré-enriquecimento.

\*\* Foram considerados para cálculos de NMP de *E. coli* somente tubos com presença desta bactéria, quando repicados em EMB agar e identificados através de provas bioquímicas.

\*\*\* Calculado sobre o número total de tubos positivos para coliformes fecais após 48 horas de incubação.

A Tabela 3 mostra o percentual de positividade de isolamento para *E. coli* nas diferentes técnicas e temperaturas de incubação (43°C, 44,5°C e 45,5°C). Todas as três temperaturas de incubação produziram NMP de coliformes fecais e *E. coli* mais baixo à 44,5°C e 45,5°C do que aquele obtido a 43°C, onde uma estimativa de  $3,6 \cdot 10^6$  col/g,  $3,7 \cdot 10^6$  col/g e  $1,0 \cdot 10^7$  col/g respectivamente de *E. coli* pode ser observada pelo uso da técnica de detecção e reparo (técnicas 1, 3, 5). O mesmo não foi verificado pelo uso de técnicas padrões onde os percentuais de enumeração se equivalem a 45,5°C e 43°C ( $\pm 35\%$ ) em detrimento de 27,7% à 44,5°C.

A correlação entre o grau de recuperação numa mesma temperatura de incubação reforçam a tendência de maior detecção de coliformes fecais à 43°C além de maior isolamento de *E. coli* (Tabela 3). Verifica-se entretanto que com relação às diferenças percentuais de enumeração e seletividade de *E. coli*, tanto entre meios líquidos quanto comparativamente pelo uso de meios sólidos às temperaturas de 45,5°C, 44,4°C e 43°C, os resultados conduzem preferencialmente à temperatura média (44,5°C) como mais seletiva, embora os percentuais de recuperação entre as médias sejam negativos.

De acordo com RAJ & LISTON (55), o meio EC não é por si só suficientemente inibitório para outros coliformes, esclarecendo que a temperatura elevada de incubação é o único fator responsável para a suposta especificidade do meio, embora haja inú-

meras evidências na literatura de que outros coliformes que não *E. coli* fecal cresceram e produziram gás em meio EC a 44,5°C (16, 29, 53, 75).

Aparentemente, a redução na enumeração de *Escherichia coli* pela técnica de detecção e reparo a 44,5 e 45,5°C pode estar correlacionada à recuperação de organismos coliformes não fecais que inibiram o crescimento e subsequente isolamento de *E. coli*. Alguns trabalhos ao longo desta linha, como os de RAJ & LINSTON (55), confirmam esta suposição ao enfatizarem que a baixa recuperação de *E. coli* Tipo I (IMViC ++ --) pode ser devida ao rápido crescimento por outros coliformes em tubo EC, antecipadamente ao da *E. coli* típica. Em contrapartida, EVANS et alii (16), afirmam que a redução de *E. coli* recuperados e isolados primariamente de tubos EC gás-positivo é considerada resultante da competição pelas bactérias não coliformes pelos nutrientes. Outras causas são ainda discutidas, como a produção de produtos inibidores por bactérias não coliformes e a falha dos meios seletivos em recuperar coliformes de tubos presuntivos gás-positivo (14, 28, 49, 55, 59).

A presença de uma flora heterogênea em alimentos contendo uma ampla variedade de coliformes é, portanto, apontada como capaz de por si só tender a desacreditar na especificidade do teste EC, assim como subestimar os métodos de reparo pelo uso de meios líquidos (20, 22, 29, 53, 55). Em adição, muitos bacteriologistas consideram que a presença de materiais alimentícios, se

melhantes aos aqui testados, em meios seletivos podem tender a alterar suficientemente a composição desses e reduzir sua seletividade em temperatura elevada (48, 55, 75).

Verificando as reações INViC (++) -- e -+ --) dos biotipos *E. coli* denominados fecais 96,5% e 93,4% mostraram reações positivas à 45,4°C e 44,5°C respectivamente (Tabela 4). Estes valores estão bem de acordo com aqueles encontrados em investigações similares, realizadas por WEISS et alii (75) e conduzem à aceitação da temperatura de 45,5°C para enumeração de *E. coli*. Entretanto, os autores acima referenciados, reproduzem a informação segundo eles extraída do "CANADIAN HEALTH PROTECTION BRANCH", de que uma temperatura de 45,0°C seria mais adequada para enumeração de coliformes fecais, uma vez que esta concilia entre 44,5°C (maior sensibilidade) e 45,5°C (maior seletividade).

#### 4.3. Interferência de organismos coliformes não fecais na seletividade da *E. coli*

Para permitir uma avaliação imparcial dos resultados obtidos, comparações entre os percentuais de detecção de *Escherichia coli* e o grau de isolamento de coliformes não fecais foram observados pelo uso de diferentes técnicas de detecção e reparo (meios líquidos e sólidos) à diferentes temperaturas.

Várias experiências têm correlacionado o grau de seletividade de *Escherichia coli* com a temperatura de incubação e temu

TABELA 4. IMViC das culturas de *Escherichia coli* isoladas através de diferentes técnicas para a enumeração de coliformes fecais

Meios/Temperaturas (°C)	Técnicas*	Nº de colônias isoladas (IMViC)				E. coli H <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	Total
		E. coli Tipo I ++---	E. coli Tipo II -+---	E. coli Intermediário I --+(-)+	E. coli Intermediário II ++(-)+		
EC/45,5	1	110	1	2	1	1	115
	2	101	3	2	1	2	109
EC/44,5	3	113	1	3	4	1	122
	4	72	2	5	2	2	83
CTABL/43	5	65	-	-	-	1	66
	6	44	-	-	1	1	46

\* Técnicas números 1, 3, 5 com pré-enriquecimento.

Técnicas números 2, 4, 6 sem pré-enriquecimento.

EC = Caldo *Escherichia coli*; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose.

po de estocagem (22, 28, 33, 53, 62, 75). Na Tabela 5 observa-se que uma elevação da temperatura de incubação proporcionou uma maior detecção de *E. coli* em meio líquido. Dentre as diversas cepas de organismos coliformes isolados destacam-se a *Escherichia coli* (60,79%), *Enterobacter cloacae* (13,82%), *Enterobacter aerogenes* (12,44%) e *Klebsiella pneumoniae* (9,32%).

A temperatura de 45,5°C, embora apresente grande número de *E. coli* isolados não foi suficiente para suprimir outros tipos de coliformes presentes nas amostras, como sugerido por FISHBEIN (20) e WEISS et alii (75), embora o índice de redução desses organismos não fecais sejam, muitas vezes, superiores a 70%. Respectivamente, *E. coli* teve significativamente mais células injuriadas recuperáveis que *Klebsiella pneumoniae* além da sensível redução de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*, assim como ausência de bactérias não-Enterobacteriaceas, quando do uso de técnicas de reparo. REBER & MARSHALL (62) tecem algumas considerações sobre a extensão de injúria celular e grau de reparo, alertando que uma vez havendo diferenças nos graus de injúria entre células individuais é óbvio existirem diferenças nas taxas de reparo entre as cepas de cada espécie. Em seus experimentos constataram também que as cepas de *E. coli* testadas tiveram uma alta percentagem de células moderadamente estressadas durante a estocagem quando comparadas às cepas de *Enterobacter aerogenes* ou *Klebsiella pneumoniae*. Estes resultados conduzem-nos ao consenso de que células injuriadas sub-letalmente de *E. coli* presentes nas

TABELA 5. Total de microorganismos isolados por técnicas com ou sem produção de gás

Meios	Temperaturas (°C)	EC-45,5		EC-44,5				CTABL-43				Total			
		1		2		3		4		5		6		Nº	(%)
		Nº	(%)												
<i>E. cloacae</i>		5	3,40	10	6,80	21	11,17	37	21,51	22	18,33	28	24,14	123	13,82
<i>E. aerogenes</i>		12	8,22	21	14,28	29	15,42	29	16,86	3	2,50	17	14,65	111	12,47
<i>E. Agglomerans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	2	1,66	-	-	2	0,22
<i>E. hafneae</i>		-	-	2	1,36	-	-	2	1,16	4	3,33	-	-	8	0,89
<i>C. freundii</i>		1	0,68	-	-	-	-	2	1,16	2	1,66	1	0,86	6	0,67
<i>K. pneumoniae</i>		12	8,22	7	4,76	13	6,19	14	8,14	20	16,66	21	18,10	83	9,32
<i>K. ozaenae</i>		-	-	1	0,68	-	-	-	-	-	-	3	2,60	4	0,45
<i>Serratia sp</i>		1	0,68	-	-	3	1,60	4	2,32	1	0,83	-	-	9	1,01
<i>E. coli</i>		115	78,80	105	71,42	122	64,90	83	48,25	66	55,0	46	39,65	541	60,79
Não Enterobacteriaceae		-	-	1	0,68	-	-	1	0,60	-	-	-	-	2	0,22
<b>Total</b>		<b>146</b>	<b>100</b>	<b>147</b>	<b>100</b>	<b>188</b>	<b>100</b>	<b>172</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>100</b>	<b>116</b>	<b>100</b>	<b>890</b>	<b>100</b>

\* Técnicas números 1, 3, 5 com pré-enriquecimento.

Técnicas números 2, 4, 6 sem pré-enriquecimento.

Nota: % calculada sobre o número de isolamentos para o gênero e/ou espécie.

amostras, encontravam-se inibidas para produzirem respostas significativas nos meios usuais, pela presença competitiva de outros organismos coliformes e/ou microorganismos não Enterobacteriaceas, tornando-se entretanto, potencialmente capazes após período de reparo em meios nutritivos.

A implicação dos dados nas Tabelas 5, 6, 8, sugerem que uma maior interferência de outras bactérias do grupo coliforme é observada quando utilizada a técnica padrão CTABL/43°C, principalmente ao que se refere à *Enterobacter cloacae*.

#### 4.4. Associação de reações falso-negativas e falso-positivas ao isolamento e recuperação de *E. coli*

Do estudo realizado, mais de 75% das cepas de *E. coli* produziram gás a 45,5°C em detrimento de cepas de *Enterobacter aerogenes* que apresentaram-se reduzidas (Tabelas 6, 7, 8), fato também comprovado por WEISS et alii (75) e FISHBEIN et alii (21) em seus estudos com aerogenes responsáveis pela baixa detecção de *E. coli* em temperaturas elevadas seriadas de 44,5 a 46,5°C.

WEISS et alii (75) ao estimarem a densidade populacional da *E. coli*, detectaram uma alta taxa de reações falso-negativas a 45,5°C, refletida na baixa percentagem dos tubos EC gás positivos para todos aqueles que mostraram crescimento. A partir desses resultados os referidos autores concluem que podemos estar partindo da primícia errada ao julgarmos que a formação de gás

TABELA 6. Número de tubos gás-positivos (G<sup>+</sup>) relacionados com microorganismos isolados

Meio/temp. (°C)	Técni ca*	Nº total de tubos ** (G <sup>+</sup> )	Nº de colônias isoladas	Microorganismos isolados (nº de isolamentos)												
				<i>E.</i> <i>cloacae</i>	<i>E.</i> <i>aerogenes</i>	<i>E.</i> <i>hafniae</i>	<i>E. coli</i> Tipo I (++--)	<i>E. coli</i> Tipo II (-+--)	<i>E. coli</i> Inter. I (-+(-)+)	<i>E. coli</i> Inter. II (++(-)+)	<i>E. coli</i> <i>H</i> <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	<i>C.</i> <i>freundii</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>K.</i> <i>ozaenae</i>	<i>Serratia</i> sp	Não-Ente robacte- riacea
EC/45,5	1	72	143	5	11	-	110	1	-	1	1	1	12	-	1	-
EC/45,5	2	71	140	10	17	-	97	3	2	-	2	-	7	1	-	1
EC/44,5	3	77	165	11	18	-	114	-	3	4	1	-	13	-	1	-
EC/44,5	4	74	151	32	17	-	72	1	5	2	2	2	14	-	4	-
CTABL/43,0	5	103	103	17	-	-	65	-	-	-	1	2	17	-	1	-
CTABL/43,0	6	92	92	23	4	-	44	-	-	-	1	-	20	-	-	-
Total		399	794	98	67	-	502	5	10	7	8	5	83	1	7	1

\* Técnicas números 1, 3, 5 com pré-enriquecimento.

Técnicas números 2, 4, 6 sem pré-enriquecimento.

\*\* (G<sup>+</sup>) - gás-positivo; EC - Caldo *Escherichia coli*; CTABL - Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose.

TABELA 7. Número de tubos gás-negativo (G<sup>-</sup>) relacionados com organismos coliformes isolados.

Meio/temp. (°C)	Técni ca*	Nº total de tubos ** (G <sup>-</sup> )	Total de colônias isoladas	Microorganismos isolados (nº de isolamentos)										
				<i>E.</i> <i>cloacae</i>	<i>E.</i> <i>aerogenes</i>	<i>E.</i> <i>hagniae</i>	<i>E.</i> <i>agglomerans</i>	<i>E. coli</i> Inter. I (-+(-)+)	<i>E. coli</i> Inter. II (++(-)+)	<i>C.</i> <i>freundii</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>K.</i> <i>ozaenae</i>	<i>Serratia</i> sp.	Não apresen tam cres- cimento
EC/45,5	1	3	3	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-
EC/45,5	2	5	8	-	4	2	-	-	1	-	-	-	-	-
EC/44,5	3	10	23	10	11	-	-	-	-	-	-	1	2	-
EC/44,5	4	11	21	5	12	2	-	-	1	-	-	-	-	1
CTABL/43,0	5	17	17	5	3	4	2	-	-	-	3	-	-	-
CTABL/43,0	6	24	24	5	13	-	-	-	1	1	1	3	-	-
<b>Total</b>		<b>70</b>	<b>96</b>	<b>26</b>	<b>44</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

\* Técnicas números 1, 3, 5 com pré-enriquecimento.

Técnicas números 2, 4, 6 sem pré-enriquecimento.

\*\* (G<sup>-</sup>) = gás-negativo; EC = Caldo *Escherichia coli*; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose; (-) = Reações positivas dehaia, ocasionalmente são encontradas para VP.

TABELA 8. Bactérias associadas com teste NMP falso-positivo

Microorganismos isolados	Técnicas* e temperaturas de incubação (°C)						Total de colônias isoladas
	EC/45,5		EC/44,5		CTABL/43,0		
	1	2	3	4	5	6	
	————— Nº de colônias —————						
<i>E. cloacae</i>	5	10	11	32	17	23	98
<i>E. aerogenes</i>	11	17	18	17	-	4	67
<i>Citrobacter freundii</i>	1	-	-	2	2	-	5
<i>K. pneumoniae</i>	12	7	13	14	17	20	83
<i>K. ozaenae</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>E. coli</i> Inter I (-+(-)+)	-	2	3	5	-	-	10
<i>E. coli</i> Inter II (++(-)+)	1	-	4	2	-	-	7
<i>E. coli</i> H <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	1	2	1	2	1	1	8
<i>Serratia</i> sp	1	-	1	4	1	-	7
Não enterobacteriaceae	-	1	-	-	-	-	1
Número total de tubos falso-positivos	32	40	51	78	38	48	287
% falso-positivos	11,14	13,94	18,34	27,17	13,24	16,67	100

\* Técnicas números 1, 3, 5 com pré-enriquecimento.

Técnicas números 2, 4, 6 sem pré-enriquecimento.

NMP = Número mais provável; EC = Caldo *Escherichia coli*.

nos caldos EC primários (denominados estágio coliforme fecal), e os tubos de Caldo EC secundários (estágio de *E. coli*), não são simplesmente um critério válido para determinar a presença em potencial da *E. coli* ou para identificar os isolados presuntivos. Ressaltam ainda ser válido um questionamento a cerca da adequação básica de determinação da *E. coli* pelo método do NMP dado o fato de que as linhagens não fermentativas e as fermentativas tardias de lactose são perdidas no estágio coliforme presuntivo. Prosseguem ainda salientando que um isolado de *E. coli* que não exiba aerogenicidade em temperaturas elevadas podem não ser um verdadeiro não-fermentador de lactose, visto que o mecanismo de produção de gás pode estar sendo afetado em temperatura acima de 45,0°C mas não a 35°C.

Análises realizadas por FISHBEIN & SURKIEWICZ (22) indicam o teste EC/45,5°C para produção de gás por *E. coli*, embora os índices de recuperação de células tenham sido ligeiramente mais elevados em temperaturas inferiores. Observações similares foram aqui também efetuadas quando pelo uso da técnica EC/44,5°C, onde obtivemos um ligeiro aumento no grau de recuperação de *E. coli* contra uma maior seletividade pela técnica EC/45,5°C.

A partir dos tubos gás-negativos deste experimento, não foi isolada *E. coli* típica, biotipo I e II, suprimindo assim a viabilidade de testes falso-negativos. A análise dos resultados apresentados na Tabela 7 sugere uma influência da temperatura de incubação no número de tubos gás-negativos ( $G^-$ ) detectados. As-

sim, com o aumento da temperatura de incubação observa-se uma redução significativa no total destes tubos assim como, no número de colônias de espécies não fecais isoladas. Esta afirmação é também válida quando comparações são realizadas entre meios sólidos e líquidos, entre meios líquidos, ou ainda entre as técnicas com uso do pré-enriquecimento e técnicas padrões. Estes resultados vêm mais uma vez assegurar o uso da temperatura de 45,5°C para incubação, como a mais seletiva dos organismos coliformes indicadores de fecalidade.

## 5. CONCLUSÕES

A ocorrência de injúria sub-letal em microorganismos coliformes são evidenciadas em condições comerciais. Assim, amostras contendo células injuriadas, constituíram problema para a estimativa da densidade populacional, tendo em vista que estas células são incapazes de proliferarem em meios seletivos usuais.

Um reconhecimento das limitações dos meios seletivos, auxilia a explicação de algumas controvérsias surgidas no controle de qualidade com o uso regular dos testes para detecção e enumeração de organismos coliformes.

O método de recuperação pelo uso de TSA com subsequente revestimento em Violet Red Bile Agar (VRBA), forneceu as mais altas contagens de organismos coliformes totais e fecais, embora os testes EC/44,5°C e EC/45,5°C tenham sido mais específicos para *E. coli*, visto que uma boa separação desses organismos de outros membros do grupo foi alcançada à essas temperaturas. Entretanto, em ambos os casos o grau de injúria refletiu a magnitude de declínio na contagem de organismos viáveis, sugerindo que a

detecção de injúria de organismos coliformes é influenciada por métodos de isolamento e temperaturas diferentes.

A injúria sub-letal foi estabelecida como um fator importante para determinar a segurança sanitária dos alimentos expostos a tratamentos físicos e químicos que danificam as bactérias indicadoras tais como coliformes fecais, e mais especificamente *E. coli* tipo I e II (IMViC ++ -- e -+ --) consideradas como principais índices de fecalidade.

A presença de espécies desconhecidas de bactérias injuriadas ou não em alimentos soma-se às dificuldades de se obter estimativas exatas de números viáveis tanto pelas técnicas comuns como pelo método de detecção e reparo. Assim, devido à variação no tempo requerido pelos organismos coliformes para reparo, pode ocorrer a multiplicação de certas células antes que outras mais debilitadas possam restaurarem-se. Para evitar essa limitação tanto da enumeração de células injuriadas quanto não injuriadas pelo caráter competitivo de colônias não coliformes, o método pelo uso de TSA seguido por revestimento de VRBA, assim como a recuperação com TSB nos testes do Número Mais Provável, podem ser apontados como eficientes na detecção de reparo de bactérias do grupo coliformes. Contudo, sugerimos que em estudos posteriores a técnica de recuperação por meios sólidos seja efetuada através do revestimento em superfície afim de averiguar os efeitos inibitórios da temperatura do agar fundido a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  na detecção desses organismos.

Os resultados procedentes deste trabalho estão em concordância com os conceitos gerais presentes na literatura, nos quais bactérias coliformes são recuperadas em meios não seletivos. Esta concordância é sustentadamente confirmada pela implicação de maior isolamento de *E. coli* em testes confirmativos de coliformes fecais com o método de pré-enriquecimento, indicando assim que uma contaminação fecal recente encontra-se confirmada no produto analisado.

## 6. RESUMO

Análises microbiológicas de queijos tipo Minas Frescal, utilizando técnicas previamente selecionadas em trabalhos anteriores, acrescidas de pré-enriquecimento em Caldo Trypticase Soy (TSB) e Agar Trypticase Soy (TSA) foram realizadas. O objetivo deste trabalho foi verificar o real significado da utilização dos meios de enriquecimento para recuperação e enumeração de coliformes totais e fecais, bem como discriminar a especificidade dos tratamentos em estudo no isolamento de *Escherichia coli*. Estas análises mostraram que o meio seletivo pode falhar na detecção desses organismos, afetando desta maneira na avaliação da qualidade sanitária do produto.

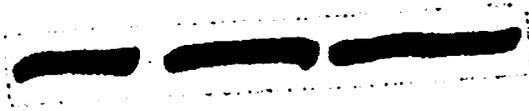
Maior reprodutividade foi obtida geralmente pelo plaqueamento do que pelo método do Número Mais Provável (NMP). O uso do Caldo Lauryl Sulfato Triptose quando usado para verificação de coliformes fecais não apresentou alterações significativas quanto à modificação do NMP (contagem média  $1,46 \cdot 10^7$  e  $1,59 \cdot 10^7$  respectivamente). Resultados similares também foram obtidos pelo uso do pré-enriquecimento ( $2,3 \cdot 10^7$  tanto para NMP-pa -

drão quanto para NMP-modificado).

Diferenças foram observadas pela modificação do método de incorporação com pré-enriquecimento em TSA. As médias obtidas,  $1,90 \cdot 10^7/g$  e  $2,60 \cdot 10^7/g$  respectivamente, sugerem que coliformes foram recuperados pelo uso da técnica de reparo. Contudo, as análises estatísticas através de comparações das médias não foram suficientes para demonstrar diferença significativa a níveis inferiores a 20% de probabilidade para qualquer das técnicas usadas para detecção de coliformes totais e fecais.

Isolamentos posteriores em Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) de colônias que apresentaram características diferentes, foram testados através de provas bioquímicas sendo o número de *E. coli* isolado comprovadamente maior em relação aos demais organismos do grupo coliforme. O caráter competitivo de colônias coliformes não fecais foi evidenciado pelos testes IMViC, que sugere a *Enterobacter cloacae* como maior oportunista e inibidor do caráter seletivo do meio EC. Foi verificado também a maior seletividade da temperatura de incubação a  $45,5^\circ C$  embora a mesma não tenha isolado o maior número de *E. coli*.

Esses resultados por conseguinte conduzem-nos à concordância quanto ao melhoramento da estimativa da densidade populacional de coliformes totais e fecais atribuído ao uso das técnicas de pré-enriquecimento, as quais aumentam a recuperação de células injuriadas em amostras de queijo frescal.



## 7. SUMMARY

Microbiological analysis of cheeses type Minas Frescal, employing technique previously selected in earlier research, in addition to pre-enrichment techniques Trypticase Soy Broth (TSB) and Trypticase Soy Agar (TSA). The objective of this study was to verify the actual meaning of the utilizing enrichment techniques in order to recover and enumerate total and fecal coliforms as well discriminate the specificity of some treatments in the isolation of *Escherichia coli*. It was shown that selective techniques can fail to detect these microorganisms, thus affecting the evaluation of the sanitary quality of the product.

Consistent results was generally obtained by plating rather than by the MPN method. The use of Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST) to verify fecal coliforms did not show significant changes regarding the modification of MPN (average count  $1.46 \cdot 10^7$  and  $1.50 \cdot 10^7$  respectively). Similar results was obtained when pre-enrichment technique was used ( $2.30 \cdot 10^7$  both for standard MPN and modified MPN).

Slight differences were observed by the modification

of the pre-enrichment method with incorporation on TSA. It was obtained,  $1.90 \cdot 10^7/g$  and  $2.60 \cdot 10^7/g$  respectively, suggesting that colliforms have been recovered by the repair technic. Nevertheless, statistical analysis showed no significant difference at levels inferior to 20% for any of the technics employed in order to detect total and fecal colliforms.

Colonies isolated on Eosin Methylene Blue Agar (EMB) of showing distinct characteristics, was tested through biochemical assays being the number of *E. coli* isolated greater than the other organisms of the colliform group.

The competitive ability of the non-fecal coliform colonies have been determined by IMViC assays, being *E. coli* as the greatest opportunistic and inhibitory microorganism of the selective EC medium. It was also observed the greatest selectivity of the incubation at  $45.5^\circ\text{C}$  although this technique has not isolated the highest population *E. coli*.

These results lead us to suggest that the estimation of population density of total and fecal coliforms can be improved by pre-enrichment techniques which enhance the recovery of injured bacterial cells in frescal cheese samples.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, F.Y. Manual de técnica bacteriológica. Zaragoza, Acribia, 1970. 510p.
2. BBL Manual of products and laboratory procedures. 5.ed. Loukeysville, Maryland, 1970. 211p.
3. BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, The William et Wilkins, 1974. 1.250p.
4. BEUCHAT, L.R. & LECHOWICH, R.V. Effect salt concentration in the recovery medium on heat-injured *Streptococcus faecalis*. Applied Microbiology, Baltimore, 16(5):772-6, May, 1968.
5. BISSONNETTE, J.J., McFETERS, G.R. & STUART, D.G. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Applied Microbiology, Baltimore, 29(2):186-94, Feb. 1975.

6. BISSONNETTE, J.J.; McPETERS, G.R. & STUART, D.G. Evaluation of recovery methods to detect coliforms in water. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 33(3):590-5, Mar. 1977.
7. BLAZEVIC, D.J. & EDERER, G.M. Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. New York, John Wiley, 1975. 136p.
8. CAMPOS, H. de. Estatística experimental não-paramétrica. 3.ed. Piracicaba, 1979, 343p.
9. CLARK, C.W.; WITTER, L.D. & ORDAL, Z.J. Thermal injury and recovery of *Streptococcus faecalis*. Applied Microbiology, Baltimore, 16(11):1764-9, Nov. 1968.
10. COLLINS, C.H. & LYNE, P.M. Microbiological methods. 4.ed. London, Butterworths, 1976. 521p.
11. COMPÊNDIO de normas e padrões para alimentos. São Paulo, ABIA, 1978. p. irr.
12. COMPENDIUM of methods for the examination of foods. Washington, APHA, 1976. 701p.
13. DEMETER, K.Y. Lactobacteriologia. Zaragoza, Acribia, 1969. 331p.

14. DEXTER, F. Modification of the standard most-probable-number procedure for fecal coliform bacteria in seawater and shellfish. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 42(1):184-5, July 1981.
15. MEDIOS de cultivo para el analisis de productos lácteos e otros productos alimentícios. In: Manual de bacteriologia; recopilacion de tecnicas. Madrid, DIFICO, 1976. p.53-68.
16. EVANS, T.M.; LeCHEVALLIER, M.W.; WAARVICK, C.E. & SEIDLER, R. J. Coliform species recovered from untreated surface "water and drinking water by the membrane filter, standard, and modified most-probable-number techniques. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 41(3):657-63, Mar. 1981.
17. FANTASIA, L.D.; MESTRANDREA, L.; SCHRADE, J.P. & YAGER, J. Detection and growth of enteropatogenic. *Escherichia coli* in soft ripened cheese. Applied Microbiology, Baltimore, 29(2):179-85, Feb. 1975.
18. FERREIRA, C.L.L.F. Valor terapêutico do iogurto e leite acidófilo. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 34(202):25-7, Mar./Apr. 1979.
19. FIRSTENBERG, E.R.; ROSEN, B. & MANHHEIM, C.H. Death and injury of *Staphylococcus aureus* during thermal treatment of milk. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 23(8): 1034-77, Aug. 1977.

20. FISHBEIN, M. Aerogenic response of *Escherichia coli* and strains of *Aerobacter* in EC broth and selected sugarbroths at elevated temperatures. Applied Microbiology. Baltimore, 10(1):79-85, 1962.
21. \_\_\_\_\_; MEHLMAN, I.J.; CHUGG, L. & OLSON JR., J.C. Coli - forms, fecal coliforms, *E. coli*, and enteropathogenic *E. coli*. In: SPECK, M.L. ed. Compendium methods for the microbiological examination of foods. Washington, APHA, 1976. Cap. 24, p. 277-300.
22. \_\_\_\_\_ & SURKIEWICZ, B.F. Comparison of the recovery of *Escherichia coli* from frozen foods and nutmeats by confirmatory incubation in EC-medium at 44,5 and 45,5°C. Applied Microbiology, Baltimore, 12(2):127-31, Mar. 1964.
23. GILLILAND, S.E.; MICHENED, H.D. & KRAT, A.A. Psychotrophic microorganisms. In: SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, APHA, 1976. Cap. 8, p. 173-8.
24. GOFF, J.H.; CLAYDON, T.J. & IANDOLO, J.J. Revival and subsequent isolation of heat-injured bacteria by a membrane filter technique. Applied Microbiology, Baltimore, 23(5): 857-62, May, 1972.

25. HACKNEY, C.R.; RAY, B. & SPECK, M.L. Repair detection procedure for enumeration of fecal coliforms and *Enterococci* from seafoods and marine environments. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 37(5):947-53, May, 1979.
26. HARTMAN, P.A.; HARTMAN, P.S. & LANZ, W.W. Violet red bile agar for stressed coliforms. Applied Microbiology, Baltimore, 29(4):537-9, Apr. 1975.
27. HILKER, J.S. Confectionery products. In: SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, APHA, 1976. Cap. 50, p. 609-13.
28. HUSSONG, D.; COLWELL, R.R. & WEINER, R.M. Rate of occurrence of false-positive results from total coliform most-probable-number analysis of shellfish and estuaries. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 40(5):981-3, Nov. 1980.
29. \_\_\_\_\_; DEMARÉ, J.M.; WEINER, R.M. & COLWELL, R.R. Bacteria associated with false-positive most-probable number test results for shellfish and estuaries. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 41(1):35-45, Jan. 1981.

30. IANDOLO, J.J. & ORDAL, Z.J. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. London, 91(1):134-42, Jan. 1966.
31. KILARA, A. & SHAHANI, K.M. Lactic fermentation of dairy food and their biological significance. Journal of Dairy Science. Champaing, 61(12):1793-800, Dec. 1978.
32. KLEIN, D.A. & WU, S. Stress: a factor to be considered in heterotrophic microorganism enumeration from aquatic environments. Applied Mycobiology. Baltimore, 27(2):429-31, Feb. 1974.
33. LeCHEVALLIER, M.W.; CAMERON, S.C. & McFETERS, G. New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 45(2):484-92, Feb. 1983.
34. LEITÃO, M.F. de F.; ROMEU, A.P. & CRUZ, R.R. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação. I. presença no solo, água e vegetais. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4:1-11, 1971/72.
35. \_\_\_\_\_. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação. II. Avaliação do teste para caracterização de coliformes fecais. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4:13-21, 1971/72.

36. MACFADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980. 527p.
37. MACKEY, B.M.; DERRICK, C.M. & THOMAS, J. The recovery of sublethally injured *Escherichia coli* from frozen meat. Journal of Applied Bacteriology. Oxford, 48(2):315-24, Apr. 1980.
38. MAXCY, R.B. Non-lethal injury and limitations of recovery of coliform organisms on selective media. Journal of Milk and Food Technology, Ames, 33(10):445-8, Oct. 1970.
39. McDONALD, L.C.; HACKNEY, C.R. & RAY, B. Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 45(2):360-5, Feb. 1983.
40. McFETERS, G.A.; CAMERON, S.C. & LECHEVALLIER, M.W. Influence of diluente, medio, and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 43(1):97-103, Jan. 1982.
41. MEHLMAN, I.J. & ROMERO, A. Enteropathogenic *Escherichia coli*: methods for recovery from foods. Food Technology, Chicago, 36(3):73-9, Mar. 1982.

42. MILBAUER, R. & GROSSOWICZ, N. Reactivation of chlorine-in - activated *Escherichia coli*. Applied Microbiology. Balti more, 7(9):67-70, 1961.
43. MITRUKA, B.M. & BONNER, M.J. Methods of detection and iden- tification of bacteria. Florida, CRC Press, 1979. 256p.
44. MONTES, A.L. Microbiologia de los Alimentos. São Paulo, Ed. Resenha Universitária, 1977. v. 2, 513p.
45. MOSS, C.W. & SPECK, M.L. Identification of nutritional com- ponents in trypticase responsible for recovery of *Escheri- chia coli* injured by freezing. Journal of Bacteriology. Washington, 91(3):1098-104, Mar. 1966.
46. MOSSEL, D.A.A.; VELDMAN, A. & EELDERINK, I. Comparison of the effects of liquid medium repair and incorporation of catalase in MacConkey type media on the recovery of ente- robacteriaceae sublethally stressed by freezing. Journal of Applied Bacteriology. Oxford, 49( ):405-19, 1980.
47. NICKERSON, J.T. & SINSKEY, A.J. Microbiology of foods and foods processing. New York, American Elsevier, 1974. 306p.
48. OCKERMAN, H.W. & STEC, J. Total plate and coliform counts for fast food service sandwiches. Journal of Food Scien- ce, Chicago, 45(2):262-6, 1980.

49. OLSON, B.H. Enhanced accuracy of coliform testing in sea - water by a modification of the Most-Probable-Number Method. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 36(3): 438-44, Sep. 1978.
50. ORDAL, Z.J.; IANDOLA, J.J. & SINSKEY, A.G. Detection and enumeration of injured microorganisms. In: SPECK, M.L. Compendium methods for the microbiological examination of foods. Washington, APHA, 1976. Cap. 7, p. 163-9.
51. PELCZAR, M.J.; REID, R. & CHAN, E.C.S. Características das bacterias. In: \_\_\_\_\_. Microbiologia. São Paulo. McGraw-Hill, 1981. v.1, pt. 2, p. 81-265.
52. \_\_\_\_\_. Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água. In: \_\_\_\_\_. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, 1981. v.2, pt. 5, cap. 29, p. 696-7.
53. POWELL, J.C.; MOORE, A.R. & GOW, J.A. Comparison of EC broth and medium A-1 for the recovery of *Escherichia coli* from frozen shucked snow crab. Applied Microbiology. Baltimore, 37(5):836-40, May, 1979.
54. PULUSANI, S.R. et alii. Antimicrobial activity of lactic cultures partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. Journal of Food Science, Chicago, 44(2):575-7, 1979.

55. RAJ, H. & LISTON, J. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. I. *Escherichia coli*. Applied Microbiology, Baltimore, 9:171-4, 1961.
56. RAY, B. & SPECK, M.L. Enumeration of *Escherichia coli* in frozen samples after recovery from injury. Applied Microbiology, Washington, 25(4):499-503, Apr. 1973.
57. \_\_\_\_\_. Discrepancies in the enumeration of *Escherichia coli*. Applied Microbiology. Baltimore, 25(4):494-8, Apr. 1973.
58. \_\_\_\_\_. Metabolic process during the repair of freeze-injury in *Escherichia coli*. Applied Microbiology. Baltimore, 24(4):585-90, Oct. 1972.
59. \_\_\_\_\_. Plating procedure for the enumeration of coliforms from dairy products. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 35(4):820-2, Apr. 1978.
60. \_\_\_\_\_. Repair of injury induced by freezing *Escherichia coli* as influenced by recovery medium. Applied Microbiology. Baltimore, 24(2):258-63, Aug. 1972.
61. RAYMAND, M.N. & ARIS, B. The Anderson-Baird-Parker direct plating method versus the most probable number procedure for enumerating *Escherichia coli* in meats. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 27:147-9, 1981.

62. REBER, C.L. & MARSHALL, R.T. Comparison of VRB and VRB-2 agars for recovery of stressed coliforms from stored acidified half-and-half. Journal of Food Protection. Ames, 45(7):584-5, May, 1982.
63. RIBEIRO, A.S.M.G. Coliformes em queijo tipo Minas Frescal: avaliação de metodologias para enumeração e isolamento. Lavras, ESAL, 1981. 86p. (Tese de Mestrado).
64. REINBOLD, G.W. Indicator organisms in dairy products. Food Technology, Chicago, 37(6):111-2, June, 1983.
65. SHARF, J.M. Indices de sanidade. In: \_\_\_\_\_. Exame microbiológico de alimentos. São Paulo, Polígono, 1972. Cap. 16, p. 173-86.
66. SPECK, M.L. & READ JR., R.B. Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. Applied Microbiology. Baltimore, 29(4):549-50, Apr. 1975.
67. STANDARD methods for the examination of dairy products. 10. ed. New York, APHA, 1953. 345p.
68. STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 13.ed. New York, APHA, 1971. 874p.
69. STILES, M.E. & LAI-KING, N.G. Biochemical characteristics and identification of Enterobacteriaceae isolated from meats. Applied Microbiology, Washington, 41(3):639-45, Mar. 1981.

70. STRAKA, R.P. & STOKES, J.L. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. Journal of Bacteriology. Washington. 78:181-5. 1959.
71. THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. Microorganisms in foods their significance and methods of enumeration. Toronto, University of Toronto Press, 1968. 225p.
72. THOMAS, S.B. Técnicas bacteriológicas para el control lactológica. Zaragoza, Acribia, 1971. 255p.
73. VIEIRA, S.D.A. & LOURENÇO NETO, J.P.M. Elaboração de queijos frescos em pequena escala. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 8(88):28-9, apr. 1982.
74. WARSECK, M.; RAY, B. & SPECK, M.L. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. Applied Microbiology. Baltimore, 26(6):919-24, Dec. 1973.
75. WEISS, K.F.; CHOPRA, N.; STOTLAND, P.; RIEDEL, G.W. & MALCOLM, S. Recovery of fecal coliforms and of *Escherichia coli* at 44,5, 45,0 and 45,5°C. Journal of Food Protection, Ames, 46(3):172-7, Mar. 1983.

## APÊNDICE

TABELA 1A. Índices de coliformes totais e fecais, e *Escherichia coli* por amostra de queijo, obtida através de diferentes técnicas de enumeração

Técnicas e meios	Coliformes totais						Coliformes fecais						<i>Escherichia coli</i> (IMVIC +---, +---)						
	LST/BVB		NMP-modificado		LST		LST/EC 45,5°C		LST/EC 44,5°C		VRBA/CTABL 43,0°C		LST/EC 45,5°C		LST/EC 44,5°C		VERBA/CTABL 43,0°C		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
1	1,1.10 <sup>6</sup>	1,1.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,3.10 <sup>6</sup>	7,2.10 <sup>5</sup>	9,0.10 <sup>3</sup>	2,1.10 <sup>4</sup>	4,0.10 <sup>3</sup>	2,3.10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1,1.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	1,1.10 <sup>6</sup>	2,5.10 <sup>6</sup>	5,0.10 <sup>3</sup>	9,3.10 <sup>3</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	9,3.10 <sup>3</sup>	9,3.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>	5,0.10 <sup>3</sup>	2,1.10 <sup>3</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	4,3.10 <sup>3</sup>	9,3.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>	5,0.10 <sup>3</sup>	-
3	2,3.10 <sup>3</sup>	2,3.10 <sup>3</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>	3,4.10 <sup>4</sup>	4,3.10 <sup>3</sup>	-	4,3.10 <sup>3</sup>	-	-	-	4,3.10 <sup>3</sup>	-	4,3.10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
4	9,3.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	3,4.10 <sup>5</sup>	2,5.10 <sup>4</sup>	9,3.10 <sup>3</sup>	2,4.10 <sup>3</sup>	4,3.10 <sup>3</sup>	4,6.10 <sup>4</sup>	2,8.10 <sup>5</sup>	2,0.10 <sup>4</sup>	9,3.10 <sup>3</sup>	2,4.10 <sup>3</sup>	4,3.10 <sup>3</sup>	1,4.10 <sup>3</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	2,5.10 <sup>3</sup>	-
5	4,3.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	9,3.10 <sup>4</sup>	9,9.10 <sup>4</sup>	5,3.10 <sup>4</sup>	4,3.10 <sup>2</sup>	2,3.10 <sup>2</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>	2,0.10 <sup>4</sup>	5,3.10 <sup>3</sup>	4,3.10 <sup>3</sup>	0,9.10 <sup>2</sup>	9,0.10 <sup>2</sup>	-	9,9.10 <sup>3</sup>	-	-
6	9,3.10 <sup>4</sup>	9,3.10 <sup>4</sup>	9,3.10 <sup>4</sup>	4,6.10 <sup>5</sup>	1,1.10 <sup>5</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>	4,6.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	4,6.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>	4,6.10 <sup>4</sup>	4,6.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	4,1.10 <sup>4</sup>	-
7	7,5.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	7,5.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,9.10 <sup>6</sup>	1,4.10 <sup>6</sup>	2,3.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>5</sup>	9,3.10 <sup>5</sup>	2,6.10 <sup>6</sup>	6,9.10 <sup>5</sup>	2,3.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,3.10 <sup>5</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>	2,8.10 <sup>5</sup>	-
8	2,4.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	4,1.10 <sup>6</sup>	2,5.10 <sup>6</sup>	2,3.10 <sup>5</sup>	4,3.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>4</sup>	4,3.10 <sup>4</sup>	3,3.10 <sup>6</sup>	1,5.10 <sup>6</sup>	9,0.10 <sup>4</sup>	4,3.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	4,3.10 <sup>4</sup>	8,2.10 <sup>5</sup>	-	-
9	4,6.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	4,6.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>5</sup>	1,6.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>4</sup>	4,3.10 <sup>4</sup>	1,6.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,3.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>	1,5.10 <sup>6</sup>	1,6.10 <sup>5</sup>	9,6.10 <sup>4</sup>	-
10	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	1,9.10 <sup>7</sup>	2,3.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	4,6.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	1,9.10 <sup>7</sup>	2,3.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	4,6.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	1,6.10 <sup>6</sup>	1,7.10 <sup>7</sup>	1,1.10 <sup>7</sup>	-
11	2,4.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	4,6.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	8,5.10 <sup>5</sup>	8,5.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	7,6.10 <sup>5</sup>	8,5.10 <sup>5</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	1,6.10 <sup>6</sup>	7,6.10 <sup>5</sup>	5,1.10 <sup>5</sup>	-
12	2,4.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	1,7.10 <sup>7</sup>	2,8.10 <sup>7</sup>	2,1.10 <sup>8</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	5,2.10 <sup>6</sup>	8,5.10 <sup>6</sup>	2,1.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	2,9.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	-	5,7.10 <sup>6</sup>	-
13	2,4.10 <sup>6</sup>	4,6.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	4,6.10 <sup>6</sup>	6,2.10 <sup>7</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	6,2.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,3.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>6</sup>	2,3.10 <sup>6</sup>	6,2.10 <sup>7</sup>	9,6.10 <sup>6</sup>	-
14	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	7,5.10 <sup>7</sup>	6,1.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	7,5.10 <sup>7</sup>	6,1.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>	7,5.10 <sup>7</sup>	6,1.10 <sup>7</sup>	-
15	2,4.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	2,4.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	1,5.10 <sup>8</sup>	2,4.10 <sup>8</sup>	2,4.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	2,1.10 <sup>8</sup>	1,5.10 <sup>8</sup>	-	9,0.10 <sup>8</sup>	-	4,0.10 <sup>8</sup>	-	-	-

Técnicas números 1, 3, 5 com pré-enriquecimento.  
Técnicas números 2, 4, 6 sem pré-enriquecimento.

TABELA 1B. Determinação do grau de significância pelo teste de Friedman e comparação múltipla dos diferentes tratamentos usados para coliformes totais em 15 amostras de queijo

Amostras	Tratamentos					
	1 <sub>a</sub>	2 <sub>a</sub>	1 <sub>b</sub>	2 <sub>b</sub>	5	6
1	11,0 (2,5)	11,0 (2,5)	24,0 (5,5)	24,0 (5,5)	23,0 (4,0)	7,2 (1,0)
2	1,1 (4,0)	0,24 (2,0)	24,0 (6,0)	11,0 (5,0)	0,25 (3,0)	0,05 (1,0)
3	0,023 (1,5)	0,023 (1,5)	2,4 (5,5)	2,4 (5,5)	1,4 (4,0)	0,34 (3,0)
4	0,93 (2,0)	2,4 (4,0)	2,4 (4,0)	2,4 (4,0)	3,4 (6,0)	0,25 (1,0)
5	0,43 (2,0)	0,23 (1,0)	2,4 (6,0)	0,93 (4,0)	0,99 (5,0)	0,53 (3,0)
6	0,93 (3,0)	0,93 (3,0)	0,93 (3,0)	4,6 (6,0)	1,2 (5,0)	0,14 (1,0)
7	7,5 (1,5)	24,0 (4,5)	7,5 (1,5)	24,0 (4,5)	29,0 (6,0)	14,0 (3,0)
8	240,0 (6,0)	24,0 (2,0)	240,0 (2,0)	24,0 (2,0)	41,0 (5,0)	25,0 (4,0)
9	46,0 (5,5)	43,0 (4,0)	46,0 (5,5)	4,3 (2,0)	16,0 (3,0)	2,4 (1,0)
10	2,4 (1,5)	240,0 (5,5)	2,4 (1,5)	240,0 (5,5)	190,0 (3,0)	230,0 (4,0)
11	24,0 (5,0)	2,4 (1,5)	46,0 (6,0)	2,4 (1,5)	8,5 (3,5)	8,5 (3,5)
12	240,0 (3,5)	240,0 (3,5)	240,0 (3,5)	240,0 (3,5)	170,0 (1,0)	280,0 (6,0)
13	24,0 (1,5)	46,0 (3,5)	24,0 (1,5)	46,0 (3,5)	620,0 (6,0)	180,0 (5,0)
14	460,0 (2,5)	460,0 (2,5)	460,0 (2,5)	460,0 (2,5)	750,0 (6,0)	610,0 (5,0)
15	2.400,0 (5,5)	1.100,0 (1,5)	2.400,0 (5,5)	1.100,0 (1,5)	2.100,0 (4,0)	1.500,0 (3,0)
Total	47,5	42,5	59,5	56,5	64,5	44,5

( ) ordens	$ R_1 - R_2  = 5,0$	$ R_2 - R_3  = 17,0$	$ R_3 - R_5  = 5,0$
$X_R^2 = 8,33$ (valor calculado)	$ R_1 - R_3  = 12,0$	$ R_2 - R_4  = 14,0$	$ R_3 - R_6  = 15,0$
$X_{0,10}^2; (V=5) = 9,24$ (valor tabelado)	$ R_1 - R_4  = 9,0$	$ R_2 - R_5  = 22,0$	$ R_4 - R_5  = 8,0$
$X_{0,25}^2; (V=5) = 6,626$ (valor tabelado)	$ R_1 - R_5  = 17,0$	$ R_2 - R_6  = 2,0$	$ R_4 - R_6  = 12,0$
$dms_{0,05} = 29,20$	$ R_1 - R_6  = 3,0$	$ R_3 - R_4  = 3,0$	$ R_5 - R_6  = 20,0$
$dms_{0,10} = 26,52$			
$dms_{0,20} = 23,42$			

TABELA 1C. Análise estatística através do emprego da diferença mínima significativa (dms) calculada por testes não paramétricos (teste de Friedman e comparação múltipla) dos diferentes tratamentos dados à 15 amostras de queijo para determinação de coliformes fecais

Amostras	Tratamentos									
	1	2	3	4	5	6				
1	0,090 (4,0)	0,21 (5,0)	0,04 (3,0)	0,23 (6,0)	0,0 (1,5)	0,0 (1,5)				
2	0,093 (3,0)	0,24 (6,0)	0,093 (3,0)	0,093 (3,0)	0,12 (5,0)	0,05 (1,0)				
3	0,043 (5,5)	0,0 (2,5)	0,043 (5,5)	0,0 (2,5)	0,0 (2,5)	0,0 (2,5)				
4	0,093 (3,0)	0,24 (1,0)	0,043 (2,0)	0,46 (5,0)	2,8 (6,0)	0,2 (4,0)				
5	0,0043 (2,0)	0,0023 (1,0)	0,24 (5,0)	0,11 (6,0)	0,2 (4,0)	0,053 (3,0)				
6	0,46 (4,5)	0,24 (2,5)	0,46 (4,5)	0,24 (2,5)	1,2 (6,0)	0,12 (1,0)				
7	2,30 (1,0)	24,0 (5,0)	4,3 (2,0)	9,3 (4,0)	26,0 (6,0)	6,9 (3,0)				
8	2,30 (3,0)	0,43 (1,5)	2,4 (4,0)	0,43 (1,5)	33,0 (6,0)	15,0 (5,0)				
9	43,0 (5,0)	43,0 (5,0)	4,3 (2,0)	43,0 (5,0)	16,0 (3,0)	2,4 (1,0)				
10	2,4 (1,5)	46,0 (3,0)	2,4 (1,5)	240,0 (6,0)	190,0 (4,0)	230,0 (5,0)				
11	24,0 (5,5)	2,4 (1,5)	24,0 (5,5)	2,4 (1,5)	7,6 (3,0)	8,5 (4,0)				
12	21,0 (1,0)	43,0 (2,5)	240,0 (6,0)	43,0 (2,5)	52,0 (4,0)	85,0 (5,0)				
13	24,0 (1,5)	43,0 (3,5)	24,0 (1,5)	43,0 (3,5)	620,0 (6,0)	140,0 (5,0)				
14	460,0 (2,5)	460,0 (2,5)	460,0 (2,5)	460,0 (2,5)	750,0 (6,0)	610,0 (5,0)				
15	2.400,0 (5,5)	1.100,0 (1,5)	2.400,0 (5,5)	1.100,0 (1,5)	2.100,0 (1,5)	1.500,0 (3,0)				
Total	48,5	44,0	53,5	53,5	53,0	42,0				

( ) ordens

$\chi^2_R = 6,45$  n.s. ao nível de 25%.

$\chi^2_{0,25; (V=5)} = 6,626$ .

TABELA 2A. Total de microorganismos isolados por diferentes técnicas

Técnicas	1	2	3	4	5	6	Total
<i>E. cloacae</i> Tip. (---+) Gás -	-	-	10	4	3	4	21
<i>E. cloacae</i> T. I (++++) Gás -	-	1	-	1	-	-	2
<i>E. cloacae</i> T. II (---) Gás -	-	-	-	2	-	-	2
<i>E. cloacae</i> T. VI (---+) Gás +	5	9	9	30	17	23	93
<i>E. cloacae</i> Outros tipos	-	-	2	-	2	1	5
<i>E. aerogenes</i> T. I (---+) Gás -	10	20	26	26	3	14	99
<i>E. aerogenes</i> T. II (++++) Gás -	2	1	3	3	-	3	12
<i>E. coli</i> Gás + T. I (Típica) (+---)	110	97	113	72	65	44	505
<i>E. coli</i> T. II (-+--) Gás -	1	3	1	1	-	-	7
<i>E. coli</i> Interm. T. I (--(-)+) Gás -	2	2	3	5	-	-	12
<i>E. coli</i> Interm. T. II (++(-)+) Gás -	1	1	4	2	-	1	9
<i>E. coli</i> H <sub>2</sub> S+	1	2	1	2	1	1	8
<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	1	-	-	2	2	1	6
<i>K. pneumoniae</i>	12	7	13	14	20	21	87
<i>K. ozaenae</i>	-	1	-	-	-	3	4
Ser. marc.	-	-	-	4	-	-	4
<i>Ser. rubidea</i>	-	-	2	-	-	-	2
<i>Ser. liquef.</i>	1	-	1	-	1	-	3
<i>Ent. hafniae</i>	-	2	-	2	4	-	8
<i>Ent. agglomerans</i>	-	-	-	-	2	-	2
Não enterobacteriacea	-	2	-	2	4	-	8
Total	146	147	188	172	120	116	890

TABELA 2B. Número de colônias isoladas relacionadas com a temperatura de incubação

Meio/temp.	CTABL 43°C		EC 44,5°C		EC 45,5°C		Total colônias isoladas
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Técnica							
Pré-enrique- cimento	120	(26,4)	188	(41,4)	146	(32,2)	454
Padrão	146	(26,6)	172	(39,5)	147	(33,8)	435
Total colônias	236	(26,5)	360	(40,5)	293	(33,0)	890

Nota: % de colônias isoladas por técnica e temperatura de incubação.

TABELA 3A. Frequência de cepas que apresentaram crescimento sem produção de gás por amostras de queijo, obtida através de diferentes técnicas

Técnicas Amostras	LST/EC 45,5°C		LST/EC 44,5°C		VRBA/CTABL 43,0°C		Total
	1	2	3	4	5	6	
1	1	-	17	11	1	4	34
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	2	-	3	-	-	5
4	2	-	-	-	3	2	7
5	-	6	-	-	8	9	23
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	1	1	2	4
8	-	-	6	5	2	4	17
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	1	-	1
12	-	-	-	1	1	2	4
13	-	-	-	-	-	1	1
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
Total	3	8	23	21	17	24	96

Técnicas números 1, 3, 5 com pré-enriquecimento.

Técnicas números 2, 4, 6 sem pré-enriquecimento.