

ELAINE MEIRE DE ASSIS

COMPORTAMENTO DE *Staphylococcus aureus* E FORMAÇÃO DE
INJÚRIA DURANTE O PERÍODO DE COMERCIALIZAÇÃO
DOS QUEIJOS MINAS E MUSSARELA

Dissertação 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

1990

COMPORTAMENTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS E FORMAÇÃO DE INJÚRIA
DURANTE O PERÍODO DE COMERCIALIZAÇÃO DOS QUEIJOS MINAS E
MUSSARELA

APROVADA:

Paschoal Guimarães Robbs

Prof. Dr. PASCHOAL GUIMARÃES ROBBS
ORIENTADOR

Alba Lúcia Solino Noletto

Profa. Dra. ALBA LÚCIA SOLINO NOLETO

Valter Roberto Linardi

Prof. Dr. VALTER ROBERTO LINARDI

Aos meus pais, Durval de Assis e Tereza Auresco de Assis pelo carinho, amor, dedicação e incentivo.

A meu estimado irmão Ismar, pelo grande afeto.

As minhas filhas Marcela e Fernanda, que tornaram tudo mais valioso

Dedico este Trabalho
com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Programa Integrado de Capacitação de Docentes (PICD), e a Coordenação de Pós-graduação da UFMT, professora Alda Beatriz de Figueiredo, pela bolsa de estudos concedida.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo apoio concedido.

Ao Departamento de Zootecnia da ESAL, pela matéria-prima cedida para o ensaio.

Ao coordenador do curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da ESAL, professor Adimilson Bosco Chitarra, pelo incentivo e amizade.

Aos professores do Curso de Mestrado em Ciência dos alimentos da ESAL, pelos valiosos ensinamentos.

A professora Alba Lúcia Solino Noletto, por suas valiosas sugestões.

Ao amigo Celso Guimarães Barbosa, por sua colaboração preciosa na parte prática e estatística do trabalho e por sua amizade sincera.

Aos amigos Antonio Carlos Nogueira e Anita Alicia Suarez Ascheri pela amizade e ajuda de forma direta ou indireta.

Ao Sr. Nilton Maciel, funcionário do laboratório de laticínios da ESAL, pela presteza e auxílio na confecção dos queijos.

A Maria do Carmo Carvalho, que sempre disponível e amiga, colaborou na montagem do experimento e revisão bibliográfica.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor Paschoal Guimarães Robbs pelo seu interesse e estímulo como orientador, por sua amizade sincera e pelos valiosos ensinamentos.

A professora Eliana Pinheiro de Carvalho, por sua inestimável ajuda e orientação na parte prática do trabalho, sua colaboração e amizade desinteressada.

A Eduardo Ramirez Asquieri, pelo companheirismo, ajuda e incansável dedicação, e sobretudo pelo amor e carinho em todos os momentos.

Aos amigos Maria de Fátima Vilhena da Silva e Francisco Hermes da Silva, pelo apoio e verdadeira amizade, a qual tornou mais suave e gratificante esses anos de trabalho.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

íNDICE

	página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. O queijo como veículo de toxinfecções	5
2.2. Injúria Bacteriana	8
2.2.1. Fatores físicos ou químicos capazes de acarretar injúria microbiana	9
2.2.2. Consequências da injúria	11
2.2.2.1. Perda da capacidade de multiplica- ção	11
2.2.2.2. Liberação de Material celular	12
2.2.2.3. Maior sensibilidade a compostos tensoativos, sais e outros elemen- tos químicos tóxicos, antibióticos corantes e pH ácido	12
2.2.2.4. Aumento acentuado da fase lag	13
2.2.2.5. Maiores exigências nutricionais ..	14

2.2.3. Mecanismo da injúria por acidez	14
2.2.4. Mecanismo da injúria térmica	16
2.3. Recuperação das células injuriadas	18
2.4. Produção de queijo Minas e Mussarela	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Caracterização geral do ensaio	25
3.2 Caracterização dos experimentos.....	25
3.2.1. Estudo dos produtos inoculados.....	25
3.2.2. Estudo dos produtos do comércio	27
3.2.3. Verificação da multiplicação durante a recuperação	27
3.2.4. Preparo do inóculo	28
3.3. Análises Química e Físico-Química	29
3.4. Análises Microbiológicas	29
3.4.1. Análises efetuada no leite	29
3.4.1.1. Contagem total de microrganismos Mesófilos	29
3.4.1.2. Enumeração de coliformes totais e fecais	30
3.4.1.3. Contagem de <u>Staphylococcus aureus</u>	31
3.4.2. Análises efetuadas nas amostras inoculadas e adquiridas no comércio	32
3.4.2.1. Contagem de <u>Staphylococcus aureus</u>	32

	página
3.4.2.1.1. Método usual	32
3.4.2.1.2. Método de reparo em meio líquido	32
3.5. Análises Estatísticas	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÕES	63
6. RESUMO.....	65
7. SUMMARY.....	68
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	70
9. ANEXOS.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
1. Análises microbiológicas do leite cru, leite contaminado, massa contaminada, soro, massa filada contaminada, utilizados na fabricação dos queijos Minas e Mussarela.....	36
2. Número de <u>S. aureus</u> FRIA-100 detectados em queijo Minas inoculado, nas metodologias tradicional e de recuperação de células estressadas, estocados a 7 9C...	44
3. Número de <u>S. aureus</u> FRIA-100 detectadas em queijo Mussarela inoculado, nas metodologias tradicional e de recuperação de células estressadas, estocados a 7 9C...	45
4. Número de colônias (a) características (b) de <u>S. aureus</u> desenvolvidas em meio Baird-Parker, utilizando-se metodologia tradicional e de recuperação de células estressadas, no exame de queijos Minas adquiridos no comércio de Lavras - MG.....	50

Tabela	página
5. Número de colônias (a) características (b) de <u>S. aureus</u> desenvolvidas em meio Baird-Parker, utilizando-se metodologia tradicional e de recuperação de células estressadas, no exame de queijos Mussarela adquiridos no comércio de Lavras - MG.....	51
6. Acidez titulável (% de ácido lático) e pH detectados em queijos Minas e Mussarela, inoculados com <u>S. aureus</u> FRIA-100, durante o período de comercialização e estocagem a 7 °C.....	41
7. Contagens de <u>S. aureus</u> e determinações de pH e acidez (% de ácido lático) no meio de recuperação de <u>S. aureus</u> (caldo "casoy"), utilizado para contagem com reparo de células estressadas, durante a produção de iogurte.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1. Comportamento da população de <u>S. aureus</u> (cepa FRIA 100) em queijo Minas inoculado, avaliado pela metodologia tradicional e pela metodologia de recuperação de células estressadas, do pH e da acidez durante a estocagem a 7 °C.....	39
2. Comportamento da população de <u>S. aureus</u> (cepa FRIA 100) em queijo Mussarela inoculado, avaliado pela metodologia de recuperação de células estressadas, do pH e da acidez durante a estocagem a 7 °C.....	40

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o consumo de queijo tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, sendo inclusive necessário a importação do produto para atender a demanda do mercado. Em 1984 foram lançados no mercado 73.197 toneladas de queijo no estado de Minas Gerais, o que representou 62% da produção nacional, MINAS GERAIS (59). O Ministério da Indústria e Comércio prevê que a produção de queijos no Brasil atingirá 175 mil toneladas/ano até 1990, MIC (12).

Hoje existem inúmeros tipos de queijo no mercado brasileiro, porém, no sul de Minas Gerais, dois tipos, o Minas frescal e o Mussarela, são extremamente consumidos pela população. O queijo Minas frescal se caracteriza por ser semi-mole, e o Mussarela um queijo de massa filada. Ambos são produzidos em grande escala a nível de pequeno produtor, que emprega, na maioria das vezes, o leite cru como matéria-prima e elabora o produto com técnicas rudimentares.

O uso do leite cru e as condições higiênico-sanitárias precárias existentes nas fazendas, contribuem em grande parte para a frequente má qualidade microbiológica do produto, trazendo riscos ao consumidor. Várias podem ser as intoxicações causadas por queijos, porém, uma que se destaca, pela frequência em produtos lácteos, é a intoxicação por Staphylococcus aureus, já havendo um grande número de surtos relatados em vários países, devido ao consumo de queijo (14,34,47,66, e 94).

No Brasil, assim como nos países em desenvolvimento, onde a pasteurização do leite frequentemente não é feita e onde nem sempre são respeitados os padrões sanitários para os produtos lácteos, S. aureus pode representar um importante perigo à Saúde Pública, BRYAN (14) e SANTOS et alii (95). Por isso, a intoxicação por Staphylococcus causada por queijos, tem recebido especial interesse pelas autoridades sanitárias de muitos países, inclusive do Brasil, segundo a International Dairy Federation, citado por SANTOS & GENIGEORGIS (94). A característica da toxina de, uma vez formada, poder resistir aos processos tecnológicos empregados na fabricação dos queijos, SANTOS et alii (95), agrava o problema.

Níveis de Staphylococcus de (\log_{10}) 5,69 a (\log_{10}) 6 céls/g de alimento são considerados capazes de produzir enterotoxina suficiente para causar a intoxicação, READ JÚNIOR et alii (88) e NOLETO & BERGDOLL (69). Pesquisas realizadas nos

últimos anos para detectar a incidência de microrganismos patógenos no leite cru e pasteurizado, revelaram uma alta incidência de S. aureus coagulase positiva, produtores de enterotoxina, a níveis elevados, (1,24,95 e 108). Entretanto, quando se analisam produtos processados, como o queijo, células injuriadas poderão estar presentes e não serem detectadas pelos processos usuais de contagem.

Considera-se como bactérias injuriadas aquelas que tenham sofrido algum dano, mas conservam a capacidade de manter certas funções, podendo recuperar o seu estado fisiológico normal, seguido de crescimento e divisão celular, quando os alimentos são removidos de condições protetoras de estocagem. Esta recuperação de bactérias pode promover alteração não perceptível no alimento, que passa a representar um potencial de risco à saúde pública, BUSTA (17) e HOBBS (37).

Assim, quando uma população de microrganismos é exposta a um ambiente de "stress", algumas células podem tornar-se injuriadas ou lesadas. Um volume substancial de dados da literatura, mostram que as células não podem se multiplicar em certos meios seletivos, após serem expostas a ambientes estressantes, tais como altas temperaturas, KLEIN & WU (51) ou a presença de agentes inibidores, ROSE & LITSKY (92) e SCHEUSNER et alii (96). A maioria dos tratamentos físicos ou químicos são conhecidos como injuriadores de bactérias, mas apenas alguns desses processos têm sido estudados com profundidade.

Em geral, a maioria dos métodos utilizados para recuperar células lesadas, incluem um processo de reparo, que restaura estas células à condições fisiológicas normais, antes de sujeitá-las à severidade do meio seletivo, ANDREW (3). Muitos pesquisadores recomendam, o uso de meios de pré-enriquecimento não-seletivo em temperatura adequada, para recuperar células, que uma vez reparadas, readquirem a capacidade de se multiplicar e formar colônias (3,19,27,49,70 e 75).

Durante a fabricação de queijo e no período de estocagem e comercialização, ocorre naturalmente um aumento na acidez e modificações de pH no produto que são, comprovadamente, fatores que podem provocar injúria às células bacterianas, RAYMAN et alii (87) e ROTH & KEENAN (93). O presente trabalho teve como objetivos:

- Verificar o comportamento da população de S. aureus, durante o período correspondente a comercialização dos queijos Minas e Mussarela, elaborados com a metodologia empregada pelos pequenos produtores de Lavras- MG;

- Observar a influência das variações de pH e acidez, desenvolvidas naturalmente nos queijos Minas e Mussarela, na formação de injúria em S. aureus inoculados;

- Comparar a metodologia usual com a que utiliza pré-enriquecimento, na enumeração de S. aureus nos queijos Minas e Mussarela adquiridos no comércio de Lavras M.G.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O queijo como veículo de toxinfecções.

Existe naturalmente um grande potencial para o queijo atuar como veículo de disseminação de um patógeno específico. No caso do S. aureus, os níveis elevados frequentemente encontrados no leite cru, constitui fonte para a contaminação dos diversos tipos de queijos frescos e curados, SANTOS & GENIGEORGIS (95). O uso de leite não pasteurizado e o abuso da temperatura durante o manuseio e estocagem do produto, agravam o problema, SANTOS & GENIGEORGIS (94). Entretanto, a legislação brasileira, MA (10), exige pasteurização do leite destinado a fabricação de queijos cujo período de cura não ultrapasse 60 dias, excluindo aqueles tipos que sofrem tratamento térmico durante o processamento como é o caso dos queijos fundidos.

Formas clínicas e subclínicas de mastites são muito prevalentes em rebanhos leiteiros (14,24,57,73 e 106). Mais que 30% dos casos de mastite em vacas que produzem leite destinados às indústrias de queijos é devido a Staphylococcus, ABBAR et alii (1). Assim, mastites por Staphylococcus, práticas

sanitárias deficientes em laticínios e transporte do leite sem refrigeração, são considerados os fatores responsáveis pela alta incidência de S. aureus em leite cru (14,38,95 e 98). Uma parte substancial dos queijos produzidos com leite pasteurizado, também apresenta evidências de contaminação fecal e estafilocócica. Isto indica a possível contaminação pós-pasteurização, decorrente das condições insatisfatórias de sanitização dos equipamentos e utensílios, ou da higiene dos manipuladores (14,50,104 e 108).

SANTOS & GENIGEORGIS (95) avaliaram a qualidade do leite cru e pasteurizado, usados para a fabricação de queijo Minas com respeito a S. aureus. Encontraram uma incidência de 46,9% nas amostras de leite cru, com contagem máxima de (\log_{10}) 5,99 céls/ml e 6,12% nas de leite pasteurizado, com contagem máxima de (\log_{10}) 3 a 4,43 céls/ml, sendo ambos níveis elevados.

O queijo pode também servir como veículo de toxinas bacterianas. Já em 1956, THATCHER et alii (104) demonstraram a ocorrência de toxinas, letais e dermonecróticas ao serem injetadas em ratos e em cobaias, e enterotóxicas para gatos, provenientes de queijos suspeitos de terem causado intoxicação. Hoje, sabe-se que as enterotoxinas produzidas por S. aureus durante a fabricação de queijos são termoestáveis e permanecem ativas por muito tempo no produto, TATINI (102).

Em 1958, nos Estados Unidos, foi relatado por MINOR & MARTH (60), um surto de 200 casos relacionados com o consumo de queijo Cheddar, em Iowa. Uma série de casos ocorreu ainda naquele ano devido ao consumo de queijo Colby, produzidos em Wisconsin.

Numa pesquisa de Staphylococcus em leite e produtos lácteos realizada na Índia por GHOSH & LAXINARAYANA (26), foi constatada uma incidência de 81,57% de Staphylococcus spp. e 31,57% de S. aureus coagulase positiva para queijo Cheddar.

No Brasil, em 1978, GALLO (23) analisou 30 amostras de queijo Minas frescal em São Paulo, encontrando presença marcante de bactérias patogênicas, inclusive S. aureus. SILVA et alii (97), em 1979, investigando queijos Minas frescal na cidade do Rio de Janeiro, constataram que, 40,3% do total de 52 amostras examinadas apresentaram níveis elevados de S. Aureus. Em 1983, GOMEZ et alii (28) estudando as condições higiênico-sanitárias do queijo Minas frescal em Lavras-MG, verificaram que 20,3% das amostras apresentaram contagens entre 5×10^5 e $1,0 \times 10^7$ células de S. aureus por grama de queijo, faixa considerada de alto risco à saúde pública.

O potencial para multiplicação de S. aureus durante a fabricação de vários tipos de queijos tem sido estudado extensivamente em vários países (38,48,91,98 e 102). Ficou

evidenciado que a possibilidade para S. aureus iniciar o crescimento e produzir enterotoxinas em queijos durante a fabricação, depende de vários fatores. Assim, verificou-se que o elevado número de microrganismos no leite inibe o crescimento de Staphylococcus, RICHARDSON & DIVAHIA (91). Portanto, o uso de uma cultura lática inicial ativa, recente, com alta concentração de bactérias, minimiza o potencial de enterotoxigênese estafilocócica (44,89,102 e 111). O efeito inibitório é mediado pela produção de ácido, bem como por outros fatores inerentes ao crescimento e ambiente formado pelo iniciador, não sendo um processo muito simples, IBRAHIM (44) e REITER et alii (89). Nos queijos em que a acidificação inicial é abaixo da normal, Staphylococcus mantém sua multiplicação nas primeiras semanas de maturação, REITER et alii (89).

O alto número de Staphylococcus no leite usado na elaboração de queijos seria provavelmente devido a superação do ambiente inibitório, permitindo sua multiplicação durante a fabricação de queijo (91,94 e 102).

2.2 - Injúria bacteriana.

A injúria bacteriana é definida como uma alteração de ordem estrutural e/ou funcional temporária nas células vivas, representando um estado fisiológico transitório causado por um

agente estressor de natureza física ou química. Estas alterações, em todos os níveis celulares, podem ser manifestadas pela inabilidade do microrganismo se multiplicar e formar colônias sob determinadas condições (3,36 e 39).

As células bacterianas injuriadas têm a capacidade de se recuperar em um ambiente propício e retornar ao seu estado fisiológico normal, concomitante ao início de crescimento e divisão celular (41,75 e 77).

O fenômeno da injúria parece ser bastante comum em cocos Gram + (Staphylococcus aureus e estreptococos fecais), em bastões Gram - (Escherichia coli, Salmonella sp, Vibrio sp.), em bactérias esporogênicas (Bacillus e Clostridium) bem como em leveduras, LEITÃO (52).

2.2.1 - Fatores físicos ou químicos capazes de acarretar injúria microbiana.

Vários processos de conservação e de preparo dos alimentos envolvem a utilização de métodos físicos ou químicos que exercem efeito deletério variável sobre a microbiota presente. Tratamentos inadequados, ou ainda, o uso crescente de processos de semi-preservação destinados a manter o "flavor" e outras qualidades organolépticas do alimento, resultam na sobrevivência de uma maior proporção de células bacterianas injuriadas

(2)

subletalmente, HOBBS (36). Pesquisas têm, entretanto, evidenciado que os processamentos que empregam calor (pasteurização ou esterilização), refrigeração, congelamento, desidratação (por liofilização, "spray - drying", tambores, etc.) e irradiação (ultravioletas ou radiações ionizantes), são capazes de provocar a formação de injúria subletal de células. O mesmo efeito é atribuído ao uso de sal, acidulantes, conservantes, desinfetantes, e de outras substâncias químicas, naturais ou adicionadas ao alimento (8,16 e 40).

A grande maioria dos meios de cultivo utilizados para o isolamento e contagem de bactérias patogênicas ou indicadoras, a partir de alimentos, apresentam em sua composição ingredientes capazes de impedir por completo a reparação e posterior multiplicação das células injuriadas, provocando um "stress" secundário nas mesmas. Dentre estes estão as substâncias tensoativas (sais biliares, desoxicolato de sódio, "teepol"), sais tóxicos (cloreto de lítio, cloreto de sódio, sulfito de bismuto, selenito de sódio, iodo, azida de sódio, telurito de potássio), corantes (verde brilhante, eosina), ácidos orgânicos (ácido tartárico, ácido acético) e antibióticos (polimixina, cicloserina), RAY (84).

É evidente que a presença de um ou mais desses compostos químicos na formulação de meios seletivos, embora possibilite o desenvolvimento e a multiplicação de células normais, exerce um

pronunciado efeito inibitório sobre as células injuriadas, levando, conseqüentemente, à obtenção de resultados incorretos por ocasião dos exames microbiológicos de alimentos, LEITÃO (52).

2 2.2 - Consequências da Injúria.

A injúria letal ou subletal ocasiona alterações em algumas características das células, o que as diferenciam das que mantiveram comportamento normal após exposição a um agente estressor. RAY (84) cita estas alterações nos seguintes aspectos:

2.2.2.1 - Perda da Capacidade de Multiplicação.

Depois de sofrerem lesão subletal, as células injuriadas geralmente são caracterizadas pela incapacidade de proliferarem e formarem colônias em meios que contenham agentes seletivos, e de readquirirem a capacidade de multiplicação quando nutrientes complexos são adicionados ao meio mínimo, na ausência de agentes restritivos (16,53 e 75). Segundo RAY & SPEAK (86), a causa da perda da capacidade das células bacterianas se dividirem, quando injuriadas, não é bem conhecida. Talvez seja devido a alterações em uma ou mais estruturas vitais ou componentes funcionais, podendo também resultar do efeito acumulativo de muitas mudanças.

2.2.2.2 - Liberação de Material Celular.

Células injuriadas frequentemente perdem alguns de seus componentes celulares através da liberação para o meio circundante. Células de S. aureus termo-injuriados, por exemplo, liberam potássio, aminoácidos e proteínas, BUSTA (17). Lipídios e fosfolipídios dos cocos gram-positivos, localizados na membrana, são perdidos por injúria térmica, o que ocasiona uma lesão nesta estrutura, HURST et alii (41). HURST (39) relata que perdas similares de compostos de célula têm sido observadas em outras bactérias injuriadas.

Obviamente, a multiplicação das células injuriadas em condições normais, vai depender da quantidade de material perdido e recuperado pela célula, BUSTA (17). MOSS & SPEAK (109) verificaram que a perda de peptídios provoca a morte da célula. Assim, a viabilidade celular também está diretamente relacionada com o tipo de produto liberado.

2.2.2.3 - Maior sensibilidade a compostos tensoativos, sais e outros elementos químicos tóxicos, antibióticos, corantes e pH ácido.

Frequentemente a injúria é observada como um aumento ou desenvolvimento de sensibilidade aos agentes seletivos, antimicrobianos, ou substâncias similares no meio de

crescimento, pelas células injuriadas, BUSTA (17). De acordo com RAY & SPECK (86), este fenômeno tem servido como base para a identificação de células estruturalmente injuriadas.

A perda da capacidade de Staphylococcus aureus injuriados subletalmente de formar colônias em meio agar seletivo contendo cloreto de lítio e cloreto de sódio tem sido atribuída, presumivelmente, ao aumento da sensibilidade a estes compostos, HURST (41). Possíveis interpretações para o fato seriam modificações na membrana ou parede celular das células injuriadas, BUSTA (17).

Um outro ponto importante é que, uma bactéria submetida a "stress" subletal, torna-se hipersensível a um "stress" secundário, MOSS & SPEAK (109), tornando mais problemática a sua recuperação em meios contendo substâncias inibidoras.

2.2.2.4 - Aumento acentuado da fase lag.

As células bacterianas injuriadas frequentemente apresentam uma extensa fase lag, o que resulta em crescimento lento e com pouco acúmulo de produtos finais. De acordo com MOSS & SPECK (62,63), a fase lag prolongada representa o tempo necessário para que as bactérias reparem o dano produzido pelas condições de "stress". Este fenômeno tem sido uma das observações constantes na injúria microbiana, mencionada por diversos pesquisadores (17,62,63,80 e 83).

2.2.2.5 - Maiores exigências nutricionais.

Uma das peculiaridades da injúria subletal é o aumento substancial do requerimento de elementos nutricionais. Verifica-se a incapacidade das bactérias injuriadas de formar colônias em meio mínimo, provavelmente devido a temporária inabilidade destas células de sintetizar todos os nutrientes necessários para o crescimento e multiplicação (39,61,62 e 100).

Certos nutrientes como "trypticase" e caseína livre de vitaminas, quando adicionados ao meio mínimo, promovem o reparo da injúria e subsequente formação de colônias, MORICHI (61), STRAKA & DRAFT (100).

2.2.3 - Mecanismo da injúria por acidez.

A injúria térmica, por congelamento e irradiação, especialmente em Staphylococcus aureus, têm sido amplamente estudada e revisada. Todavia, a injúria causada por exposição a concentrações subletais de ácidos tem sido pouco pesquisada, BLANKENSHIP (9), ZAYAITZ & LEDFORD (110). A acidez dos diferentes alimentos varia muito, naturalmente ou como resultado do uso de aditivos ácidos ou básicos, MATCHES & LISTON (56). De acordo com ROTH & KEENAM (93), a exposição de microrganismos a um ambiente ácido pode provocar injúria e morte celular. Os pesquisadores destacam a importância do conhecimento do efeito

da acidez na enumeração de células bacterianas encontradas em alimentos ácidos.

A extensão da injúria e morte bacteriana, varia com o tipo e com a concentração de ácido. Em estudos efetuados com Escherichia coli, PREZYBYLSKI & WITTER (82) e REYNOLDS (90), e com Salmonella bareilly, BLANKENSHIP (9), verificou-se que a exposição da célula a uma crescente concentração de ácido ou a um decréscimo de pH sob concentração constante de ácido, causa um aumento da morte e injúria. Segundo REYNOLDS (90), o fato decorre das maiores concentrações de ácidos não-dissociados, os quais são difundidos para o interior das células, onde são dissociados, causando desnaturação dos constituintes celulares. Da mesma forma, BLANKENSHIP (9) relacionou a injúria e morte celular em altas concentrações de ácidos, com o índice de difusão do ácido não-dissociado no interior da célula.

NUNHERIMER et alii (71) relataram que o efeito dos ácidos minerais é proporcional à concentração hidrogeniônica, enquanto que a toxicidade dos ácidos orgânicos é devido a ação de moléculas não-dissociadas. ROTH & KEENAN (93) verificam que a extensão da injúria normalmente é maior após o tratamento com ácidos orgânicos do que com ácidos inorgânicos.

BLANKENSHIP (9), ao investigar a injúria ácida e recuperação de Salmonella baireilly, concluiu que a síntese

protéica, síntese de RNA, transporte de elétron, muitos sistemas enzimáticos, e ribossomos são afetados nas células ácido-injuriadas.

Estudando características da injúria e recuperação de Staphylococcus aureus expostos aos ácidos acético, clorídrico e láctico, ZAYAITZ & LEDFORD (110) verificaram que as atividades da coagulase e termonuclease foram reduzidas nas células injuriadas. A não evidenciação de vazamento na célula, constatada a 260/280 nm, juntamente com a ausência de mudança nos ácidos graxos da membrana, indicaram que não houve lesão de membrana na injúria ácida. Observaram também inibição da síntese de RNA. Durante a recuperação, ocorreu renaturação e síntese de proteínas, inclusive de enzimas e proteínas ribossomal, proporcionando condições intracelulares para um subseqüente crescimento.

2.2.4 - Mecanismo da injuria térmica

Dano térmico ou injúria térmica é um termo que se usa para descrever uma resposta induzida pelo calor e que se manifesta com uma diferença no número de colônias ou células viáveis, que se obtém em dois ou mais meios nutritivos de composição diferente, GOMEZ (29). O meio que se usa para enumeração das bactérias é de grande importância, pois certo número de células

seria capaz de reparar o dano térmico sob as condições de um determinado meio, mas não em outro. Considera-se que o dano térmico é um fenômeno precursor da morte ou inativação pelo calor. De acordo com HURST (41), o aquecimento em temperaturas na faixa de 52 °C é capaz de provocar efeito injuriante em S. aureus, observando-se uma sensibilidade ao meio manitol-sal.

O grau de injúria térmica pode variar se houver combinação com outros agentes, tais como: congelamento e descongelamento, liofilização, redução da umidade, meio nutritivo, irradiação e adição de conservadores, acidulantes, BLANKENSHIP (9).

BUCKER et alii (15) confirmam as pesquisas de MARTIN et alii (55) sobre o comportamento de S. aureus injuriados pelo calor, onde constataram a inibição do crescimento da bactéria em meios com elevadas concentrações de sal; nestas condições havia um efeito inibitório sinérgico do calor e do NaCl, ocasionando redução da atividade da catalase e conseqüentemente o acúmulo de peróxido de hidrogênio.

Alguns autores sugerem que a desnaturação protéica seja a causa da morte térmica das bactérias, devido a coincidência entre certos parâmetros termodinâmicos em ambos processos, PELLON et alii (77).

Estudos realizados com Escherichia coli termo-injuriadas demonstraram a liberação de lipopolissacarídeos da membrana externa, HITCHNER et alii (35). Com efeito, a perda de material com absorvância a 260 nm e 280 nm e a saída de constituintes celulares durante o tratamento térmico têm sido demonstradas em diferentes microrganismos, GRAY et alii (31), o que indica uma má função da membrana citoplasmática. PIERSON et alii (78), observaram em seus estudos com Salmonella typhimurium aquecida a 48 °C, que a reconstituição da membrana ocorre no princípio do processo de reparação celular, o que torna possível a recuperação de outras lesões. Os mesmos autores sugeriram que os lipídios sintetizados depois do tratamento térmico são empregados na reconstituição da membrana, o que foi confirmado por TOMLINS et alii (105).

Pesquisas evidenciam que o aquecimento pode causar danos ao RNA, porém ions Mg^{++} podem inibir a degradação dos ribossomos. Este efeito parece ser devido a ação de uma ribonuclease, que é termoestável (7, 31 e 42).

2.3 - Recuperação das células injuriadas

As células bacterianas injuriadas subletalmente têm a capacidade de atuar em um ambiente não inibitório, e podem retomar seu estado fisiológico normal concomitante com a iniciação do crescimento e divisão celular, BUSTA (16). Após a

recuperação, a bactéria pode mostrar as mesmas propriedades originais, incluindo patogenicidade e enterotoxidade (46,49 e 101). Devido a esta habilidade de reparo, inclusive nos alimentos, têm-se pesquisado intensivamente a detecção de células injuriadas através de análises microbiológicas, HARTMAN (33).

Para recuperação de células de S. aureus termo-injuriados, ORDAL (74) recomenda que os meios tenham uma fonte de energia (glicose), aminoácidos, e fosfato inorgânico. De acordo com STRAKA & STOKES (100), certos nutrientes, como o "tripticase", adicionados ao agar mínimo, proporciona um aumento na recuperação das células estressadas. O conteúdo de peptídios do "tripticase" favorece a restauração, pois auxilia na ressíntese de proteínas que foram desnaturadas, principalmente as enzimas essenciais. RAY & SPECK (86) concluíram que a capacidade de peptídios, aminoácidos e outros componentes de promover a recuperação celular, reside na ressíntese e na redução do processo de degradação do sistema vital à célula.

Outro fator importante é o peróxido de hidrogênio, que é letal às células injuriadas, e forte oxidante com pronunciados efeitos bactericidas. Este composto é produzido, durante a respiração da maioria dos microrganismos pela ação de certas enzimas, McDONALD et alii (58). HARMON et alii (32) relataram ainda, a presença de peróxido formados nos meios durante a

preparação e estocagem. Já HARMON et alii (18), VAN NETTEN et alii (107) afirmam que seria a partir da oxidação de manganês e/ou citrato. A suplementação do meio com compostos que degradam peróxido de hidrogênio, ou bloqueiam a sua formação, tem sido muito investigada (6,55,65 e 87). BAIRD-PARKER & DAVENPORT (6) informam que a incorporação de piruvato de sódio 1% ou catalase ao meio, decompõem o peróxido de hidrogênio, aumentando a enumeração de S. aureus injuriados. FLOWERS et alii (22) confirmam que a adição da catalase ao TSBS aumenta a enumeração tanto de células termo-estressadas como não stressadas e sugerem ainda, que a inabilidade destas células de formar colônias em meios seletivos é devido, pelo menos em parte, a um decréscimo da atividade da catalase celular e a presença de altos teores de sal no meio.

A principal característica apresentada pelas células injuriadas de Staphylococcus aureus é a perda de resistência ao cloreto de sódio, normalmente empregado em concentrações variáveis de 7,5 a 10% nos meios seletivos de enriquecimento ou isolamento, HOBBS (36), HURST (40). Entretanto, tais células são capazes de se reparar e multiplicar em meios adequados, não seletivos, e sem adição de cloreto de sódio, HURST (39), GRAY et alii (30). Somente depois da fase de recuperação as células poderiam ser expostas àqueles ambientes seletivos, segundo Ray & Johnson, citados por RAY (83).

Vários compostos (incluindo telurito de potássio, em concentrações elevadas), usados nos meios para selecionar Staphylococcus patogênicos, são inibitórios para o crescimento de células estressadas, GRAY & et alii (31) e IANDOLA & ORDAL (43).

A injúria devido a tratamentos subletais é reversível e pode ser reparada em um ambiente favorável em temperatura adequada. Para a enumeração e isolamento de bactérias indicadoras e patogênicas de alimentos comercializados, são sugeridos dois métodos designados como "reparo-líquido" em caldo não-seletivo e "reparo-sólido" em meio contendo agar, RAY (84). A desvantagem do primeiro método é a possibilidade da multiplicação de células normais interferir na contagem das células reparadas, LEITAO (52).

2.4 - Produção de queijos Minas e Mussarela

Segundo a técnica de OLIVEIRA (72), a matéria-prima ideal para fabricação dos queijos tipo Minas e Mussarela é o leite integral, ou seja, com teor de gordura na faixa de 3 a 4%. Sob o ponto de vista higiênico-sanitário, o leite para queijos frescos deve ser submetido a pasteurização. Na prática, o procedimento de pasteurização é realizado nos laticínios; artesanalmente, porém, o leite empregado na elaboração de queijos é "in natura", ou seja, o leite cru, o que representa

riscos para o consumidor. Costuma-se destinar o leite mais ácido para a fabricação de Mussarela, uma vez que se considera que o aquecimento da massa durante a filagem pode substituir a pasteurização. Entretanto, têm sido demonstrado que a temperatura da massa durante esta fase, geralmente não ultrapassa 60 °C, o que não é suficiente para pasteurizá-la, ainda mais que o tempo de filagem é de 15 a 20 minutos.

Na coagulação do leite emprega-se a cultura ou fermento láctico selecionado. Em nossas indústrias, o mais comum é o emprego de uma cultura mesófila à base de Streptococcus lactis e/ou Streptococcus cremoris, tanto para o queijo Minas quanto para o Mussarela. Na ausência do fermento láctico, principalmente quando se emprega o leite pasteurizado, o produto resultante é insípido e torna-se muito mais fácil a invasão por fermentações anormais, como por exemplo, o estufamento precoce causado por coliformes.

O emprego de 5% de uma boa cultura em relação ao leite é plenamente satisfatório para produção do queijo Minas. Já para o Mussarela, normalmente usa-se entre 1 e 2% de cultura, pois a operação de filagem é inteiramente dependente de uma prévia acidificação de massa. Para maior segurança, aconselha-se adicionar a cultura no início da operação de enchimento do tanque, de modo que haja um intervalo de 20 a 30 minutos antes da adição do coalho, ou até que a acidez atinja o aumento de

10D A coagulação deve ocorrer na faixa de 32 a 34 °C e usando cloreto de cálcio na base de 25 g/100 l de leite, no caso de leite pasteurizado.

Após a coagulação e quando o coágulo atingir a consistência adequada, procede-se ao corte visando obter grãos com 1 cm de aresta. Efetua-se uma agitação cuidadosa durante aproximadamente 1 minuto e a seguir, deixa-se em repouso 3 a 5 minutos. Logo após, procede-se a nova agitação, procurando dispersar a massa que se decanta durante o repouso. No queijo Minas a agitação lenta e o repouso vão se alternando até atingir o ponto, cerca de 45 a 50 minutos a contar da primeira mexedura. Os períodos de agitação e de repouso podem variar, resultando numa maior dessora, o que leva a obtenção de um queijo mais ou menos úmido. O produtor deseja, na maioria das vezes, obter queijos com o máximo de umidade a fim de aumentar o rendimento; entretanto, quanto maior a umidade pior é a conservação, além do aumento da exudação. A massa é colocada em formas e prensada por 16 a 18 horas.

No queijo Mussarela, o corte é realizado em cubos menores, 0,4 a 0,5 cm de aresta, a fim de se obter maior dessora. A agitação deve ser contínua e a princípio lenta, e depois mais rápida, procurando manter toda a massa dispersa no seio do soro. Após cerca de 20 minutos a contar do corte, inicia-se o aquecimento gradativamente, não devendo ultrapassar a

temperatura de 40 °C. Após a massa atingir a consistência desejada, efetua-se a separação do soro da massa, deixando que esta se compacte sozinha por alguns minutos. A massa em fatia é colocada sobre mesas em locais frescos (15-20 °C), permanecendo nessas condições até que se desenvolva a acidez adequada para a filagem. O ponto crítico da filagem é a acidez da massa, que deve ser suficiente para levar o pH para cerca de 5,2, o que se obtém deixando-se a mesma de um dia para o outro (cerca de 15 a 24 horas). A massa é filada em água quente (cerca de 80 °C) e atinge de 50-55 °C. A filagem costuma ser realizada manualmente, utilizando-se pás de madeira, sendo completada com as mãos. A moldagem é realizada colocando a massa filada em formas próprias.

A salga geralmente é feita em salmoura, contendo 18 a 20% de sal, por aproximadamente 24-48 horas em temperatura de 10-15 °C. Tradicionalmente, o queijo Minas deve ser salgado por salga seca, o que dá origem a uma crosta mais macia, típica desses queijos. Posteriormente, são enxaguados rapidamente para retirar o excesso de sal e colocados para enxugar. O teor médio de sal para o Mussarela, situa-se em torno de 1,5% e para o queijo Minas de 1,6%. Em geral, ambos os tipos não são submetidos à cura, sendo consumidos na forma frescal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Caracterização geral do ensaio

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Laticínios da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em duas etapas: 1- Inoculação, fabricação, armazenamento e análises microbiológicas e químicas de queijos Minas frescal e Mussarela. 2 - Pesquisa microbiológica dos queijos acima citados, comercializados em Lavras-MG. Na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, foi realizada terceira etapa para a avaliação da multiplicação na técnica de recuperação celular.

3.2 Caracterização dos experimentos

3.2.1 - Estudo dos produtos inoculados

Na fabricação dos queijos foram utilizados um total de 80 litros de leite cru, adquiridos no setor de Zootecnia da ESAL. O leite foi inoculado com Staphylococcus aureus FRIA-100, produtor

de enterotoxina A, originado do Food Research Institute e gentilmente cedido pela Dra. Alba L. Solino Noletto, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O inóculo foi preparado previamente, numa proporção de modo a se obter uma concentração na massa da ordem de 10^6 células de S. aureus por grama de produto.

Foram elaboradas três peças de queijos Minas com o inóculo contaminante, na proporção de 10 céls/g, com aproximadamente 1kg cada. usando-se os iniciadores Streptococcus lactis e Streptococcus cremoris em razão de 5% e coalho em 0,0020%. A salga seca foi realizada em 24 horas. Nas mesmas condições, foram elaborados 3 queijos Mussarela, com excessão da salga, que se deu em salmoura 1% de NaCl em 48 horas.

Os queijos foram fabricados com leite cru, conforme técnica tradicional para cada tipo, já descritas anteriormente, OLIVEIRA (72), acondicionados em bandejas e estocados em geladeira, numa temperatura de 7°C, em condições semelhantes à comercialização dos queijos artesanais. Os produtos foram analisados por um período de 40 e 60 dias, para os queijos Minas e Mussarela, respectivamente, sendo as análises feitas em intervalos irregulares (2 a 4 dias, chegando a variar de 10 a 15 dias no final dos experimentos).

3.2.2 - Estudo dos produtos do comércio

Foram examinadas cinco marcas diferentes de queijo Minas frescal e cinco de Mussarela, adquiridos em diferentes supermercados e em outros estabelecimentos comerciais.

As coletas foram feitas nas mesmas condições em que os queijos são adquiridos pelo consumidor, ou seja, embalados em plástico e papel de embrulho. Desta forma foram transportadas ao laboratório para se proceder às análises.

Foram realizadas dez coletas em dias diferentes, para se obter amostras de lotes distintos, sempre nos mesmos estabelecimentos comerciais, sendo analisadas um total de 50 amostras de queijo Minas e 50 de Mussarela.

3.2.3 - Verificação da multiplicação durante a recuperação

No estudo do período de recuperação utilizou-se iogurte, fabricado com um litro de leite longa vida, inoculado com 2% de cultura lática (iogurte natural comercial) e com Staphylococcus aureus FRIA-100 para se obter uma contagem da ordem de 10^6 céls/ml de leite. Depois de homogeneizado, separou-se em 4 frascos estéreis com tampa que foram incubados a 40°C/3h.

As análises microbiológicas, e de pH foram realizadas a partir do início da incubação do leite inoculado (tempo zero), em intervalos de uma hora, perfazendo um total de quatro amostragens. De cada amostra transferia-se uma alíquota para caldo não seletivo "Casoy" (na proporção 1:10) que foi incubada a 37 °C/2h, sendo realizadas quatro contagens de S. aureus (em intervalos de 30 minutos), bem como medidas a acidez e pH.

O motivo da utilização do iogurte neste estudo é o seu curto tempo de elaboração, sendo um produto láctico fermentado que desenvolve considerável teor de acidez, condição desejável para tal estudo.

3.2.4 - Preparo do Inóculo

A cultura estoque de Staphylococcus aureus FRIA-100, foi mantida à 4-7 °C em "Brain heart infusion agar" (BHI) inclinado, sendo repicadas mensalmente.

A partir da cultura estoque foi feita a repicagem para "brain heart infusion broth" e incubado à 37 °C/24h. As células foram centrifugadas e lavadas em solução salina esterilizada 0,85% por três vezes à 15.000 g em centrífuga refrigerada a 5 °C. Após a última lavagem desprezou-se o sobrenadante, e as células foram ressuspensas em água peptonada 0,1%. Procedendo-se a leitura desta suspensão em espectrofotômetro marca Bausch &

Lomb-Spectronic 20 (540 nm), pode-se obter o número de microrganismos contidos na mesma, através de uma curva padrão (Anexo I), relacionando o número de microrganismos obtidos por contagem em "Tryptic soy agar", elaborada previamente.

3.3 - Análises Químicas e Físico-Químicas

A acidez titulável foi determinada utilizando-se o método recomendado pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, PREGNOLATO et alii (81), e o pH medido em um potenciômetro Beckman. Estas análises foram efetuadas somente nas amostras de queijo e de iogurte inoculadas com Staphylococcus aureus FRIA-100.

3.4 - Análises Microbiológicas

3.4.1 - Análises efetuadas no leite

3.4.1.1 - Contagem total de Microrganismos Mesófilos

Esta determinação foi realizada usando-se o meio "Plate Count Agar" (MERCK). A inoculação foi feita por incorporação de 1 ml das diluições decimais de até 1:1000.000. Após homogeneização e solidificação do agar, as placas em duplicata, foram incubadas a 32 °C/48h, quando se procedeu às contagens das placas que continham entre 30 e 300 colônias.

3.4.1.2 - Enumeração de Coliformes Totais e Fecais

Os coliformes totais e fecais foram pesquisados pelo método do Número Mais Provável (NMP), compreendendo as seguintes etapas:

. Teste Presuntivo

A enumeração de coliformes totais foi efetuada a partir das diluições, das quais retirou-se alíquotas de 1 ml sendo inoculadas série de 3 tubos com "Lauryl Sulfate Tryptose Broth" CLST (MERCK), por diluição. Os tubos com CLST foram incubados à 35 °C/24-48h, sendo a presença de gás nos tubos de Durham considerada como resultado positivo.

. Teste Confirmativo

A confirmação para coliformes totais foi efetuada a partir dos tubos positivos no teste presuntivo, que foram repicados para tubos contendo caldo de verde brilhante lactose bile (2%) (MERCK), sendo então incubados à 37 °C/24-48h. Os tubos que apresentaram formação de gás foram considerados positivos.

. Coliformes fecais

Os tubos positivos no teste presuntivo foram repicados

para tubos contendo caldo EC (Merck), os quais foram incubados a 44,5 °C/24h. Os tubos que apresentaram formação de gás foram considerados positivos.

3.4.1.3 - Contagem de Staphylococcus aureus

Empregou-se o método usual, recomendado pelos órgãos de inspeção sanitária, MA (11) e por ORDAL et alii (75). A amostra do alimento foi misturada, sob condições assépticas, em água peptonada 0,1% estéril, na relação 1:10, obtendo-se a diluição inicial, a partir da qual, procedeu-se às diluições decimais subsequentes. No caso da amostra de queijo, utilizou-se solução de citrato de sódio 2% para a diluição inicial. As contagens presuntivas de S. aureus foram obtidas por plaqueamento em superfície de 0,1 ml (em triplicata) em placas previamente preparadas e secas com meio seletivo "Baird-Parker agar" (MERCK - 5406) de composição: extrato de carne 5,0 g, peptona de caseína 10 g, extrato de levedura 1,0 g, piruvato de sódio 10 g, Glicocola 12 g, Cloreto de lítio 5,0 g, agar-agar 15 g, água destilada 1000 ml, 3,0 ml de solução de telurito de potássio 3,5%, 50 ml de emulsão de gema de ovo a 50%, pH 6,8. Depois de espalhar o inóculo com uma alça de Drygalsky, às placas foram incubadas a 37 °C/48h, quando procedeu-se as contagens das colônias típicas de S. aureus (negras, brilhantes, convexas, de 1 a 5 mm de diâmetro aproximadamente, com bordas brancas, rodeadas por um halo claro transparente de 2 a 5 mm).

3.4.2 - Análises efetuadas nas amostras inoculadas e nas adquiridas no comércio

3.4.2.1 - Contagem de Staphylococcus aureus

3.4.2.1.1 - Método Usual

O procedimento foi o mesmo utilizado para os queijos controle, descritos acima, tendo sido utilizado para a homogeneização das amostras, copo esterilizado de liqüidificador, de alumínio, e como diluente inicial uma solução de citrato de sódio a 2%.

No caso dos queijos comerciais, a contagem foi presuntiva, de cada placa foram selecionadas 3-5 colônias típicas e atípicas e feita coloração de gram para verificação da presença de cocos gram positivos.

3.4.2.1.2 - Reparo celular em meio líquido

As amostras foram preparadas pela mistura de 25 g, de queijo com 225 ml de caldo não seletivo Casoy (MERCK-5459), com a seguinte composição: peptona de caseína 17 g, peptona de farinha de soja 3,0 g, D(+) glicose 2,5 g, cloreto de sódio 5,0 g di-potássio-hidrogenofosfato 2,5 g, água destilada 1000 ml, pH 7,3. Para o reparo, incubou-se à 37 °C/2h, sendo que, logo em

seguida, preparou-se as diluições para o plaqueamento em meio seletivo (agar Baird- Parker), conforme recomendação de ORDAL et alii (75), RAY & ADAMS (85).

O percentual de células não detectadas, no caso dos queijos inoculados, foi calculado através da equação matemática descrita por RAY (82), $(1-S/NS) \times 100\%$, em que S= contagem no meio seletivo e NS= contagem no meio não seletivo.

3.5 - Análises Estatísticas

As análises estatísticas das médias das contagens microbianas (três repetições), após transformação em raiz quadrada, foram feitas utilizando-se a análise de variância e através do teste F de Fisher-Snedecor, considerando um delineamento em blocos casualizados para o experimento com queijos comercializados, e um delineamento em blocos inteiramente casualizados para o experimento com queijos inoculados.

As fontes de variações com probabilidade igual ou inferior a 5% pelo teste F foram comparadas posteriormente pelo teste de Tukey, PIMENTEL (79).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite utilizado para fabricação dos queijos apresentou níveis microbiológicos que indicam, como era de se esperar, a necessidade de uma prévia pasteurização, conforme se pode observar pela Tabela 1. As contagens de coliformes totais e fecais foram elevadas, indicando a possibilidade de presença de outros patógenos entéricos. No caso de leite empregado para produção da Mussarela, a elevada contagem de S.aureus mostra que a matéria-prima pode ser uma importante fonte de contaminação dessa bactéria.

A Figura 1 expressa o comportamento das contagens de S. aureus realizadas pelas duas técnicas (com e sem recuperação de células), bem como as variações de acidez e do pH durante o período de armazenagem a 7°C do queijo Minas inoculado. Percebe-se claramente que há um aumento gradual da acidez durante o período de estocagem, variando de 0,078 % de ácido lático no primeiro dia a 0,909% de ácido lático no quadragésimo dia. Paralelamente, e de forma discreta, há uma queda no pH do produto (de 6,6 a 5,1). Quadro bastante semelhante ocorreu

durante o período correspondente a estocagem e comercialização do queijo tipo Mussarela (Figura 2), em que se percebe uma queda no pH acentuada na primeira semana (de 6,6 para 5,7) e posteriormente lenta (de 5,7 para 5,3) até o final do experimento (60 dias). Entretanto, o aumento da acidez foi praticamente constante, ou seja, sem picos, durante todo o período, variando de 0,099 para 1,265% de ácido láctico. A tabela 6 complementa as figuras 1 e 2, com os resultados de acidez e pH

O fato de utilizar no presente estudo um iniciador ativo à base de Streptococcus lactis e Streptococcus cremoris, associado à flora láctica normal do leite cru, influenciou de certa forma no comportamento das contagens de S. aureus. Pelos resultados vistos, verifica-se que foi satisfatória a acidez desenvolvida no produto elaborado no experimento.

SANTOS & GEONIGEORGIS (94), constataram que o uso de iniciador, tipo de inóculo e tempo de maturação, afetam significativamente o pH final do queijo Minas (5,22 com iniciador versus 5,45 sem iniciador, em 28 dias). O uso do iniciador, segundo os autores, é importante para as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas, pois fermentam a lactose do leite, provocando a queda do pH para cerca de 5,9 nas primeiras 18 horas do processamento e para 5,1-5,2 durante a maturação, contribuindo para o

Tabela 1. Análises microbiológicas do leite cru, leite contaminado, massa contaminada, soro, massa filada contaminada, utilizados na fabricação dos queijos Minas e Mussarela*

Amostra	tipo	<u>S. aureus</u> (UFC/ml)	Coliformes (UFC/ml)	<u>E. coli</u> (UFC/ml)	Mesófilos (UFC/ml)
Leite cru	Minas	zero	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$
	Mussarela	$3,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$4,4 \times 10^6$
Leite contam.	Minas	$7,7 \times 10^7$	ND	ND	ND
	Mussarela	$2,2 \times 10^6$	ND	ND	ND
Massa contam.	Minas	$5,0 \times 10^6$	ND	ND	ND
	Mussarela	$3,4 \times 10^7$	ND	ND	ND
Soro	Minas	$3,4 \times 10^4$	ND	ND	ND
	Mussarela	$3,6 \times 10^5$	ND	ND	ND
Massa filada	Mussarela	$3,6 \times 10^6$	ND	ND	ND

ND - não determinado

* - O tempo de realização das análises foi imediatamente após cada etapa do processo.

desenvolvimento do "flavor" característico do queijo. Concomitantemente, confirmam que Staphylococcus são geralmente pobres competidores microbianos, sendo o número deste microrganismo significativamente mais baixo em queijo Minas feito com iniciador do que sem ele. Outrossim, DELAZARI et alii (20), verificaram durante o armazenamento de queijo Minas, um significativo aumento da população de bactérias lácticas, resultando em uma queda acentuada do pH (de 6,6 para 5,4 a 4 °C e de 6,6 para 4,9 a 15 °C), no final de oito dias de estocagem. Verificaram também que, nos experimentos em que houve um pronunciado desenvolvimento de bactérias lácticas, a acidez final oscilou de 0,950 a 1,426%, e nos que houve um desenvolvimento discreto destas bactérias, a acidez final ficou na faixa de 0,594 a 0,63%. No presente trabalho, a acidez desenvolvida no queijo Minas no período de nove dias (cerca de 0,52%), pode ser considerada baixa em relação às verificadas por DELAZARI et alii (20), entretanto, deve-se levar em consideração que a temperatura empregada por aqueles pesquisadores (15 °C) foi bem superior a utilizada neste trabalho (7°C), o que pode explicar o fato.

Ao estudar a inativação de S. aureus (10^8 céls/ml) em um meio artificial contendo ácido láctico, MINOR & MARTH (60) observaram um declínio da população de 10.000 vezes após 24 horas de incubação a 37°C, quando o pH do meio era de 4,3. A inativação inicial de S. aureus cultivado em produtos lácticos

não foi, todavia, tão grande como a observada em meio artificial. A sobrevivência de Staphylococcus em um meio artificial aparentou ser exclusivamente uma função da concentração hidrogeniônica, enquanto que nos produtos lácteos, segundo os autores, parecia estar relacionado com outros fatores presentes, além do pH. É conhecido que as bactérias lácticas podem inibir o S. aureus em queijos pelo efeito da diminuição do potencial redox, em combinação com o ácido láctico, pH e produção de outras substâncias inibidoras, STADHOUDERS et alii (99). Assim, reduções de 5,8 vezes nas contagens de S. aureus após 60 dias de maturação foram obtidas pela inoculação do leite com 1% de cultura de S. Lactis em queijo "Manchego", GAYA et alii (25).

O pH do produto em questão pode não ser um fator limitante para Staphylococcus, visto que alimentos com pH na faixa de 5,1 a 9,0, contendo S. aureus, podem ser considerados como capazes de causar intoxicação, SCHEUSNER et alii (96). Com efeito ALCALA et alii (2), obtiveram dados sobre o conteúdo de umidade, atividade de água e pH de quatro tipos de queijos espanhóis, sendo os valores encontrados não inibitórios, por si só, da multiplicação de microrganismos produtores de intoxicações alimentares bem como da produção de toxinas. Já em pH entre 4,0 e 4,5, EL-BANNA & HURST (21) verificaram que a 37°C, células de S. aureus, em presença de ácido láctico, morreram um pouco mais rápido que a 46°C. A 37°C as células não puderam ser isoladas depois de 2 dias a pH 4, mas foram detectáveis depois de 7 dias

Figura 1 - Comportamento da população de *S. aureus* (cepa FRIA-100) em queijo Minas inoculado, avaliado pela metodologia tradicional e pela metodologia de recuperação de células estressadas; do pH e da acidez durante a estocagem a 7 ± 2°C.

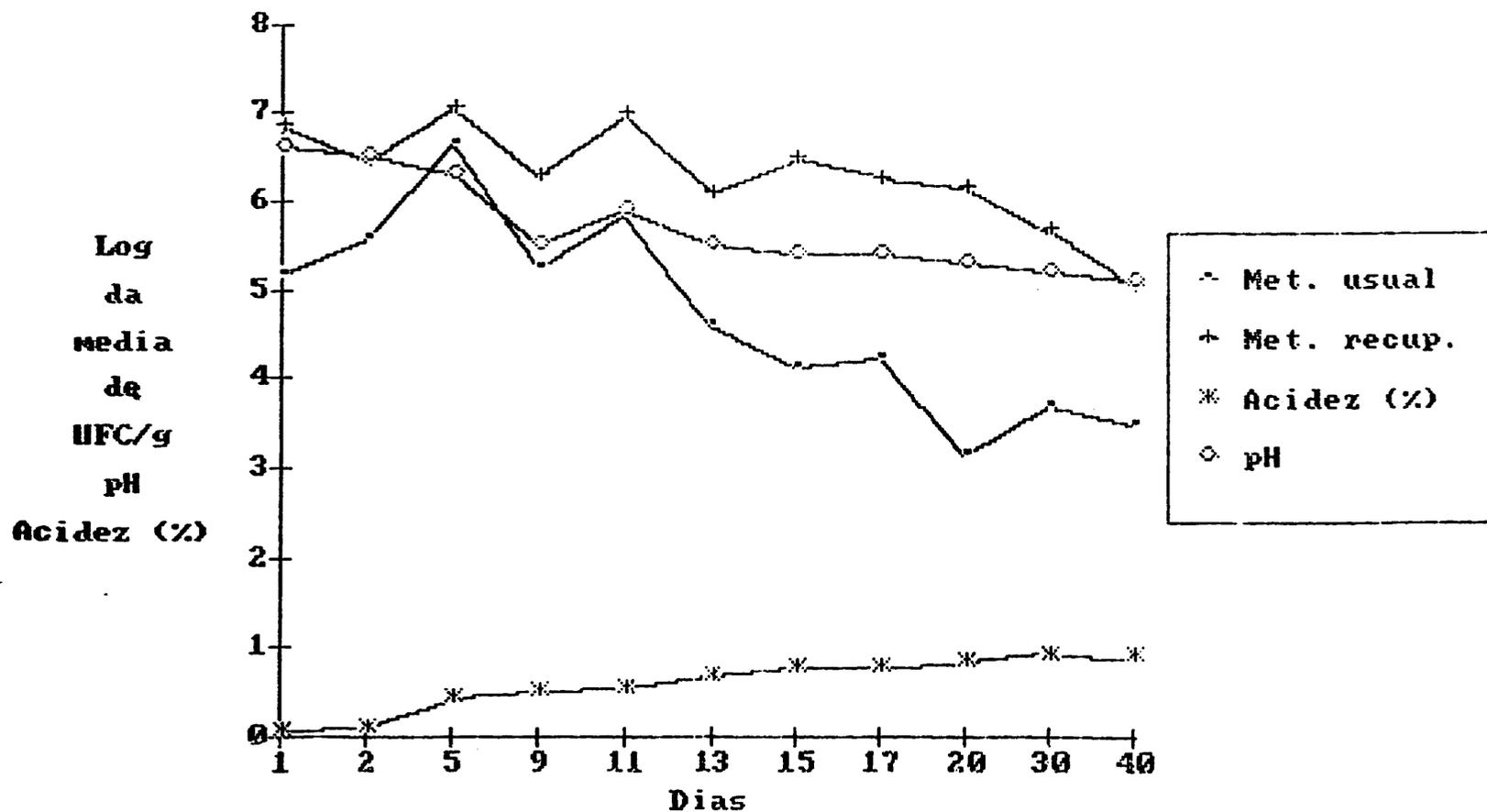


Figura 2 - Comportamento da população de *S. aureus* (cepa FRIA-100) em queijo Mussarela inoculado, avaliado pela metodologia tradicional e pela metodologia de recuperação de células estressadas; do pH e da acidez durante a estocagem a 7 ± 20C.

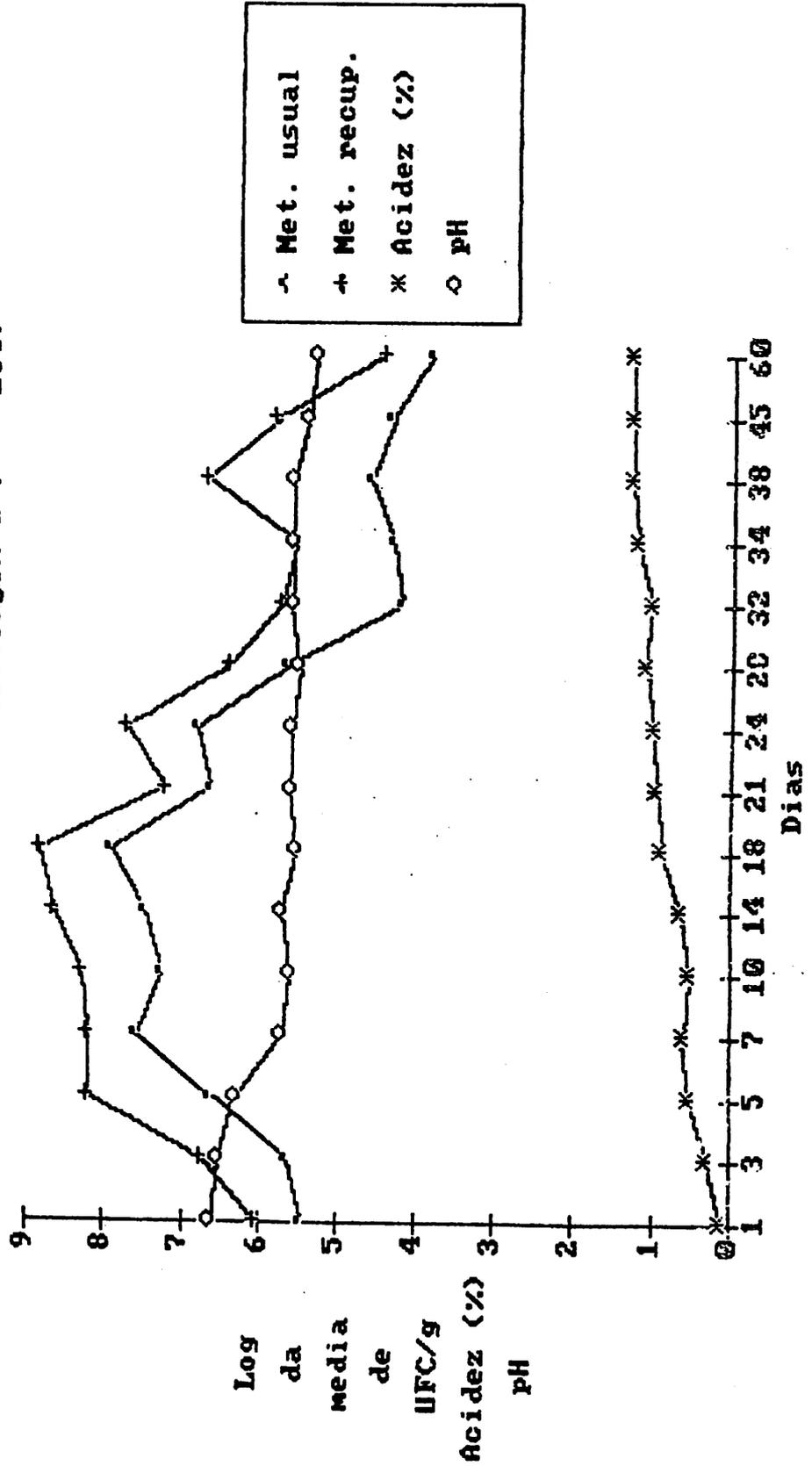


TABELA 6 - Acidez titulável (% de ácido lático) e pH detectados em queijos Minas e Mussarela, inoculados com S. aureus FRIA-100, durante o período de comercialização e estocagem a $7 \pm 2^\circ\text{C}$.

Minas			Mussarela		
Estocagem (dias)	Acidez (% ác. lát.)	pH	Estocagem (dias)	Acidez (% ác. lát.)	pH
1	0,078	6,6	1	0,099	6,6
2	0,118	6,5	3	0,277	6,5
5	0,435	6,3	5	0,490	6,3
9	0,520	5,5	7	0,588	5,7
11	0,588	5,9	10	0,511	5,6
13	0,686	5,5	14	0,633	5,7
15	0,784	5,4	18	0,882	5,5
17	0,784	5,4	21	0,931	5,6
20	0,833	5,3	24	0,980	5,6
30	0,931	5,2	28	1,078	5,5
40	0,909	5,1	32	1,029	5,6
			34	1,198	5,6
			38	1,274	5,6
			45	1,278	5,4
			60	1,265	5,3

a pH 4.5 Já a um pH 5, ambos tipos de células cresceram. Os autores ressaltaram que esses resultados já eram esperados, visto que a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos é devido principalmente à moléculas não dissociados. BAIRD-PARKER (5) tabulou a proporção do total de ácidos não dissociados a diferentes valores de pH. Reportou que 35% do total de ácido acético ocorre em forma não dissociada a pH 5, enquanto 85% ocorre a pH 4. Similarmente, 6 e 39% do total de ácido láctico apresentou-se na forma não dissociada a pH 5 e 4, respectivamente. Portanto, pequenos decréscimos de pH podem significar grandes aumentos na proporção de moléculas não dissociadas.

No presente estudo, a temperatura de estocagem, tanto do queijo Minas como do Mussarela, foi de 7°C, faixa geralmente empregada na comercialização em geladeiras ou câmaras frigoríficas. Verificou-se, nesta temperatura, um aumento acentuado nas contagens de S. aureus, especialmente após ao segundo ou terceiro dia, indicando adaptação ao ambiente, Tabela 2 e 3. DELAZARI et alii (20), também observaram um maior desenvolvimento de S. aureus nos primeiros dias após ao processamento do queijo tipo Minas.

Nas Tabelas 2 e 3 pode-se observar também, as oscilações das cargas de S. aureus avaliadas pelas duas técnicas de contagem (com e sem recuperação de células). Analisando de uma

forma geral, verifica-se que as contagens, no queijo tipo Minas (Tabela 2), pelo método usual aumentaram quase 2 ciclos logarítmicos nos primeiros 5 dias, passando posteriormente a cair de modo gradativo. Com relação ao queijo Mussarela (Tabela 3), o quadro já foi diferente. Até os 18 dias, houve um aumento muito acentuado das contagens de S. aureus (cerca de 3 ciclos logarítmicos), apesar de ter havido uma queda pronunciada do pH (de 6,5 para 5,5) e um aumento razoável de acidez (de 0,099% para 0,882%). O declínio do número de células, entretanto, só começou, e rapidamente, após este período. No queijo Minas, observou-se que este fato ocorreu de forma mais gradual.

O desenvolvimento de S. aureus durante a produção e estocagem de diversos tipos de queijos foram estudados. Durante a manufatura do queijo Cheddar, TATINI et alii (103) verificaram aumentos de 6-12 vezes no número de S. aureus, sendo o crescimento mais rápido nos estágios iniciais, e mais lento durante a prensagem; aumentos estes, atribuídos à multiplicação celular. Verificaram também uma relação direta entre as contagens do leite e do queijo resultante. Já em queijo Minas, SILVA et alii (97), demonstraram que na temperatura recomendada para refrigeração (0-4 °C), a população de S. aureus se manteve praticamente inalterada durante todo o período de estocagem (14 dias). Verificaram também que, apesar do desenvolvimento das bactérias lácticas não ter sido significativo, o que pode ser observado pela discreta queda de pH, estas devem ter limitado a

TABELA 2 - Número de S. aureus FRIA-100 detectados em queijo Minas inoculado ^a, nas metodologias tradicional e de recuperação de células estressadas, estocados a $7 \pm 2^\circ\text{C}$.

Amostras	Tempo (dias)	Contagem ^b pela m. trad. (UFC/g)	Contagem ^b pela m. recup. (UFC/g)	% de células não detectadas ^c	Contraste de médias (Tukey 5%)
1	1	$1,5 \times 10^5$	$7,2 \times 10^6$	97,9	s
2	2	$3,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	86,4	s
3	5	$4,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	60,0	s
4	9	$1,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	91,1	s
5	11	$7,0 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$	92,5	s
6	13	$3,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$	96,8	s
7	15	$1,3 \times 10^4$	$2,9 \times 10^6$	99,6	s
8	17	$1,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	99,1	s
9	20	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^6$	99,9	s
10	30	$4,8 \times 10^3$	$4,5 \times 10^5$	98,9	ns
11	40	$2,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	97,4	ns

a - Inóculo de $2,0 \times 10^6$ células/ml de leite

b - média aritmética da contagem em 3 placas

c - percentagem de células não detectadas $(1 - S/NS) \times 100\%$ em que S = contagem no meio seletivo e NS = contagem no meio não seletivo.

s - significativo

ns - não significativo

TABELA 3 - Número de S. aureus FRIA-100 detectados em queijo Mussarela inoculado ^a, nas metodologias tradicional e de recuperação de células estressadas, estocados a 7 ± 2°C.

Anostras	Tempo (dias)	Contagem ^b pela m. trad. (UFC/g)	Contagem ^b pela m. recup. (UFC/g)	% de células não detectadas ^c	Contraste de médias (Tukey 5%)
1	1	2,8x10 ⁵	1,1x10 ⁶	74,5	ns
2	3	4,3x10 ⁵	5,3x10 ⁶	91,9	ns
3	5	4,0x10 ⁶	1,6x10 ⁸	97,5	s
4	7	3,8x10 ⁷	1,6x10 ⁸	76,3	s
5	10	1,7x10 ⁷	1,9x10 ⁸	91,1	s
6	14	2,9x10 ⁷	4,3x10 ⁸	93,3	s
7	18	7,7x10 ⁷	6,7x10 ⁸	88,5	s
8	21	4,1x10 ⁶	1,6x10 ⁷	74,4	s
9	24	6,5x10 ⁶	5,4x10 ⁷	88,0	s
10	28	4,4x10 ⁵	2,5x10 ⁶	92,8	ns
11	32	1,5x10 ⁴	5,5x10 ⁵	97,3	ns
12	34	2,0x10 ⁴	3,6x10 ⁵	94,4	ns
13	38	4,0x10 ⁴	5,0x10 ⁶	99,2	s
14	45	2,1x10 ⁴	6,2x10 ⁵	96,8	ns
15	60	6,4x10 ³	2,6x10 ⁴	75,4	ns

a - Inóculo de 2,2x10⁶ células/ml de leite

b - média aritmética da contagem em 3 placas

c - percentagem de células não detectadas (1 - S/NS)x100% em que S = contagem no meio seletivo e NS = contagem no meio não seletivo.

s - significativo

ns - não significativo

multiplicação dos estafilococos. Já em temperatura imprópria para conservação (15°C), a proliferação das bactérias lácticas foi ligeiramente maior, resultando em queda do pH nos sete primeiros dias de estocagem. No décimo quarto dia, quando a pequena redução desta população foi acompanhada de um aumento no pH, observaram um aumento na população de S. aureus. Outro trabalho que demonstra a multiplicação, mas em queijo Cheddar, é o de IBRAHIM (45), o qual verificou que a estocagem destes queijos salgados a 11°C, representava um potencial de risco devido aos significativos aumentos nas contagens de S. aureus e da concentração de enterotoxinas. Quando queijos não salgados foram estocados à mesma temperatura, a contagem de S. aureus diminuiu e não houve mudanças na concentração de enterotoxinas; todavia, sérias alterações no "flavor" ocorreram após duas semanas. A 4°C as contagens de S. aureus decresceram em maior proporção nos queijos não salgados do que nos salgados, e em ambas condições não houve mudança na concentração de enterotoxina.

Com relação a salga, SANTOS & GEONIGEORGIS (94) também comentam que o NaCl utilizado no processo de fabricação de queijos pode ter efeito sobre a microflora láctica e, conseqüentemente, sobre a microflora patogênica. Citam como fator inibitório para a cultura láctica comercial usada para queijo Minas, a salga, a qual provoca grande redução do número destes microrganismos. Desta forma, há diminuição da competição

microbiana, e S. aureus se multiplica a níveis perigosos durante o período de maturação. Esses mesmos autores verificaram que o leite para fabricação de queijos, quando foi inoculado com S. aureus FRIA-100 a nível de $(\log_{10})4,23/\text{ml}$ ou mais alto, houve multiplicação do patógeno. Das 47 amostras de queijo por eles analisadas, 27 (57%) apresentaram contagens de S. aureus acima de $(\log_{10})7$ céls/g, quando não se empregou iniciador. Em queijos elaborados com iniciador, somente 7 (15%) de 46 amostras apresentaram contagens superiores a $(\log_{10})7$ céls/g.

Uma grande contribuição para o entendimento do problema foi dada por ZEHREN & ZEHREN (111). Através do exame da fabricação de 378 partidas de queijos Cheddar, demonstraram que em 59 delas houve formação de enterotoxina estafilocócica A, em decorrência do desenvolvimento anormal de acidez. Assim, observaram valores que se situaram entre 0,16 a 0,35% em 56 amostras e menos que 0,20% em 26 amostras. Em queijos produzidos sem adição de cultura láctica, o número de S. aureus aumentou de 120 vezes nas primeiras horas. Outro fator que possivelmente predispos o queijo Cheddar a formação de enterotoxinas foi o teor de sal, ligeiramente mais alto (2,3%) que o recomendado (1,7%). Concluem também que o pH dos queijos não é realmente tão bom indicador do possível desenvolvimento de enterotoxina estafilocócica quanto a acidez titulável, durante a fabricação dos queijos. Este fato pode ser também observado no trabalho de OTERO et alii (76), que utilizando caldo APT, verificaram que em

baixo pH 4,81, as bactérias lácticas tinham apenas um ligeiro efeito inibitório sobre a população de S. aureus e somente durante os últimos estágios de crescimento. Isto, possivelmente ocorreu devido as diferenças entre o poder tampão do caldo empregado e das massas de queijos. Isto fica claro na Tabela 6, especialmente no caso do queijo Mussarela, onde se observa que do nono ao trigésimo oitavo dia o pH praticamente não variou e, no entanto, a acidez subiu de 0,59 para 1,27%. O poder tamponante da proteína de queijo não permite, portanto, uma boa avaliação do desenvolvimento da acidez, através do pH. NAGUIB et alii (67) também admitem o efeito inibitório do iniciador sobre o crescimento de S. aureus, durante a manufatura do queijo Ras. O desenvolvimento da acidez média, observada depois da prensagem, de 1,66%, foi possivelmente, a principal razão para a diminuição nas contagens de S. aureus.

Assim, de um modo geral, os resultados obtidos mostram um quadro semelhante ao relatado pela literatura, ou seja, nos dois tipos de queijo ocorre um aumento no número de estafilococos após o preparo, mais especificamente até a primeira semana, no queijo Minas, e até cerca de duas semanas e meia no Mussarela. Posteriormente, em decorrência do aumento de acidez, ou de outro fator associado, provocado pela microflora láctica como escasez de nutrientes, o número de S. aureus cai de uma forma rápida e contínua no queijo Mussarela e lentamente no Minas. Um fato que deve ser ressaltado é que, neste último tipo de queijo, o

decréscimo de S. aureus ocorre mais precocemente (5 dias) que no Mussarela (18 dias); isto, apesar do queijo Minas ter neste período, uma acidez de 0,43%, e o outro até uma acidez de 0,88%. Fica claro aqui também, que não é somente a acidez o fator que provoca o decréscimo da população de S. aureus.

As contagens presuntivas de S. aureus gram positivos do queijo Minas e Mussarela do comércio de Lavras, as Tabelas 4 e 5 mostram que a contaminação por esta bactéria é frequente, e que os níveis de contagem são elevados nos produtos colocados à venda. Embora não se tenha verificado a produção de coagulase e, mais especificamente, a capacidade de produzir toxinas das cepas desenvolvidas em meio Baird-Parker, presume-se que há um grande risco em potencial destes produtos para causar surtos de intoxicação estafilocócica. Para o queijo Minas, por exemplo, contagens superiores a 10^6 UFC/g foram verificadas em 8% das amostras, na faixa de 10^5 e 10^6 UFC/g em 16%, e entre 10^3 - 10^5 em 76%, isto pela metodologia usual. Já no queijo Mussarela, o quadro não é muito diferente; 10% das amostras apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/g, 12% entre 10^5 - 10^6 UFC/g, e 78% na faixa de 10^3 - 10^5 UFC/g, através da metodologia usual. Em contraste, a legislação, BRASIL (13), permite no máximo 10^3 células de S. aureus por grama de queijo frescal.

TABELA 4 - Número de colônias ^a características ^b de S. aureus desenvolvidas em meio agar Baird-Parker, utilizando-se metodologia tradicional e de recuperação de células estressadas, no exame de queijos Minas adquiridos no comércio de Lavras - MG.

Repetições	Métodos ^c	Marcas				
		A UFC/g	B UFC/g	C UFC/g	D UFC/g	E UFC/g
1	I	9,1x10 ³	1,0x10 ³	5,8x10 ⁴	7,8x10 ⁵	6,9x10 ³
	II	9,1x10 ⁴	1,0x10 ⁴	9,4x10 ⁵	3,4x10 ⁶	2,9x10 ⁴
2	I	1,6x10 ⁵	8,5x10 ³	8,1x10 ³	9,0x10 ³	3,5x10 ⁵
	II	1,0x10 ⁶	1,4x10 ⁴	5,9x10 ⁴	9,3x10 ⁴	6,0x10 ⁶
3	I	<1,0x10 ³	4,0x10 ³	9,5x10 ³	1,9x10 ⁵	1,2x10 ⁵
	II	<1,0x10 ⁴	5,8x10 ⁴	2,0x10 ⁴	2,4x10 ⁶	1,0x10 ⁶
4	I	7,9x10 ³	9,0x10 ³	1,0x10 ³	9,5x10 ³	6,2x10 ⁴
	II	9,6x10 ⁴	8,6x10 ⁴	1,0x10 ⁴	1,2x10 ⁴	6,6x10 ⁵
5	I	8,0x10 ³	3,5x10 ⁵	8,5x10 ³	9,0x10 ³	6,9x10 ⁴
	II	9,7x10 ⁴	1,6x10 ⁷	9,5x10 ⁴	1,1x10 ⁴	7,8x10 ⁶
6	I	9,5x10 ³	9,5x10 ⁴	9,5x10 ³	1,4x10 ⁶	1,2x10 ⁶
	II	1,2x10 ⁴	7,9x10 ⁵	1,4x10 ⁴	1,8x10 ⁷	1,5x10 ⁷
7	I	8,0x10 ³	8,5x10 ³	1,0x10 ³	7,0x10 ³	8,5x10 ³
	II	8,5x10 ⁴	9,5x10 ⁴	1,0x10 ⁴	8,0x10 ⁴	5,8x10 ⁴
8	I	1,0x10 ³	1,5x10 ⁶	1,0x10 ³	8,6x10 ³	4,5x10 ⁵
	II	1,0x10 ⁴	1,3x10 ⁷	1,0x10 ⁴	4,0x10 ⁴	7,1x10 ⁶
9	I	1,0x10 ³	3,0x10 ⁴	1,0x10 ³	1,9x10 ⁴	3,1x10 ⁵
	II	1,0x10 ⁴	4,3x10 ⁵	1,0x10 ⁴	3,8x10 ⁵	7,6x10 ⁶
10	I	9,5x10 ³	8,0x10 ³	9,5x10 ³	1,0x10 ³	1,5x10 ⁶
	II	8,0x10 ⁴	9,5x10 ⁴	2,8x10 ⁴	1,0x10 ⁴	1,1x10 ⁷

a - média aritmética de 3 leituras em placas.

b - colônias negras, brilhantes, convexas, de 1 a 5 mm de diâmetro aproximadamente, com bordas brancas, rodeadas por um halo claro transparente de 2 a 5 mm.

c - I : método tradicional

II: método de recuperação de células estressadas.

TABELA 5 - Número de colônias ^a características ^b de S. aureus desenvolvidas em meio agar Baird-Parker, utilizando-se metodologia tradicional e de recuperação de células estressadas, no exame de queijos Mussarela adquiridos no comércio de Lavras - MG.

Repetições	Métodos ^c	Marcas				
		A UFC/g	B UFC/g	C UFC/g	D UFC/g	E UFC/g
1	I	1,1x10 ⁵	8,5x10 ³	2,4x10 ⁵	1,0x10 ³	3,9x10 ⁴
	II	2,4x10 ⁶	1,8x10 ⁴	8,8x10 ⁶	1,0x10 ⁴	5,2x10 ⁵
2	I	9,0x10 ³	3,4x10 ⁴	1,9x10 ⁴	5,8x10 ³	1,0x10 ³
	II	1,2x10 ⁴	5,9x10 ⁵	3,8x10 ⁵	7,8x10 ⁴	1,0x10 ⁴
3	I	1,0x10 ³	1,0x10 ⁴	9,5x10 ⁴	9,0x10 ³	9,5x10 ³
	II	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	1,6x10 ⁶	3,8x10 ⁴	6,2x10 ⁴
4	I	3,7x10 ⁴	3,8x10 ³	1,0x10 ³	4,1x10 ⁴	1,0x10 ³
	II	5,6x10 ⁵	7,2x10 ⁴	1,0x10 ⁴	7,6x10 ⁵	1,0x10 ⁴
5	I	8,7x10 ⁵	1,0x10 ³	9,5x10 ³	1,1x10 ⁶	7,6x10 ⁴
	II	9,8x10 ⁶	1,0x10 ⁴	9,5x10 ⁴	2,1x10 ⁷	8,4x10 ⁵
6	I	1,2x10 ⁶	1,0x10 ³	6,7x10 ⁵	1,4x10 ⁶	8,0x10 ³
	II	1,8x10 ⁷	1,0x10 ⁴	9,0x10 ⁶	1,9x10 ⁷	8,0x10 ⁴
7	I	8,5x10 ³	8,0x10 ³	2,0x10 ⁶	1,3x10 ⁵	9,5x10 ³
	II	9,0x10 ⁴	9,5x10 ⁴	1,3x10 ⁷	1,0x10 ⁶	9,0x10 ⁴
8	I	1,0x10 ⁶	1,0x10 ³	8,8x10 ³	2,6x10 ⁴	9,5x10 ³
	II	1,4x10 ⁷	1,0x10 ⁴	7,0x10 ⁴	7,0x10 ⁵	9,0x10 ⁴
9	I	4,2x10 ⁵	3,2x10 ³	1,0x10 ³	1,9x10 ³	8,1x10 ³
	II	2,4x10 ⁶	8,8x10 ⁴	1,0x10 ⁴	5,2x10 ⁴	8,8x10 ⁴
10	I	2,9x10 ⁴	1,0x10 ³	7,9x10 ³	9,3x10 ⁴	5,2x10 ⁴
	II	9,0x10 ⁵	1,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴	6,6x10 ⁵	7,4x10 ⁵

a - média aritmética de 3 leituras em placas.

b - colônias negras, brilhantes, convexas, de 1 a 5 mm de diâmetro aproximadamente, com bordas brancas, rodeadas por um halo claro transparente de 2 a 5 mm.

c - I : método tradicional

II: método de recuperação de células estressadas.

Certamente, a causa para estas contagens elevadas é o processo de fabricação utilizado, que não emprega pasteurização. Esta é uma prática extremamente desaconselhada e não permitida pela nossa legislação para estes tipos de queijos. Entretanto, toda a fabricação caseira, que tem uma grande participação nos queijos comercializados em Lavras, emprega esta tecnologia. Pesquisas já revelaram uma ocorrência de S. aureus em leite cru no estado de MG, de cerca de 46,9%, com contagem média de (\log_{10}) 4,69 UFC/ml, SANTOS et alii (95). ARAUJO (4) verificou incidência de S. aureus de 50%, com contagens entre 30 a 110.000/ml de leite cru, em Pirassununga-SP. Constata também que, tanto bovinos quanto o homem, tiveram participação importante para a contaminação por S. aureus, nas amostras analisadas.

Uma das causas das elevadas contagens de S. aureus em leite cru é a alta incidência de mastite estafilocócica clínica e subclínica em vacas leiteiras (4,24,100,68 e 100). Por outro lado, os Staphylococcus podem ser provenientes de manipuladores, de fontes como a boca, nariz, mãos ou lesões na pele, BRYAN (14) e THATCHER (104). Queijos fabricados com leite cru com elevada carga microbiana podem, comprovadamente, representar um risco de intoxicação alimentar por Staphylococcus. A má qualidade do leite, somada a possíveis contaminações por equipamentos e manipuladores durante a fabricação dos queijos, podem tornar ainda mais grave o problema.

Grande número de trabalhos registram o potencial de queijos para veicular patógenos, especialmente Staphylococcus (14,36,54,104, e 111). É necessário, em vista dos resultados, uma providência por parte das autoridades sanitárias, no sentido de orientar a estes pequenos produtores sobre o perigo de fabricar-se queijo com leite cru, já que intoxicação estafilocócica é apenas um dos riscos, pois há muitos outros e mais perigosos, tais como brucelose, salmonelose e listeriose. Assim, através dos meios de comunicação, deve-se conscientizar e informar de como fazer a pasteurização de forma caseira. O consumidor deve também ser alertado sobre o risco que está correndo ao consumir produtos com esta qualidade microbiológica. Se ambos trabalhos forem feitos, pelo menos a longo prazo, pode-se mudar o quadro atual, que é muito grave e não deve permanecer simplesmente como um problema sem solução. A significativa diferença que houve nas contagens das diferentes marcas (Tabela 4 e 5) mostra que há possibilidade de, mesmo nas condições atuais, obter-se queijos com melhor qualidade microbiológica. Uma outra indicação destes resultados é que se deve estudar, em maior profundidade, a população de S. aureus presentes nestes produtos, já que constitui um potencial para produzir intoxicação.

O quadro obtido no comércio de um modo geral, apoia o comportamento de S. aureus observado nos experimentos de estocagem. Viu-se que o leite pode apresentar uma carga já

elevada de S. aureus (Tabela 1); que ocorre inicialmente uma multiplicação (de até 2 ciclos log) e posteriormente redução, de no máximo 1,5-2,0 ciclos do número de S. aureus do queijo recém-produzido, no período correspondente a comercialização. Assim, teoricamente, partindo-se de um leite com 1000 S. aureus/ml, ter-se-á uma massa com cerca de 10.000/g, com a concentração de cerca de 10 vezes que pode ocorrer, TATINI et alii (103); este número poderá chegar a 1000.000/ml e posteriormente ser reduzido até 100/g, isto já no final do período de comercialização. Com efeito, a maioria das contagens observadas estavam entre 10.000 e 1000.000/g (76% das amostras de queijo Minas e 78% das de queijo Mussarela).

Com relação ao aspecto de desenvolvimento de injúria ácida durante o período de estocagem e comercialização dos queijos Minas e Mussarela, trabalhos, TATINI et alii (103) ZAYAITZ & LEDFORD (110), demonstram que a acidez, dependendo do tipo de ácido e da concentração, promove o estressamento de células microbianas, inclusive de S. aureus.

Pelos resultados observados através das Figuras 1 e 2 e pelas análises estatísticas (Anexos 2 e 3), pode-se notar que houve uma diferença bastante significativa entre as contagens tradicionais em meio Baird-Parker agar e as contagens feitas após recuperação de célula em meio caldo "Casoy", por duas horas, antes do plaqueamento em Baird-Parker agar, metodologia

esta recomendada por ORDAL et alii (75). Estes resultados levam a crer que há formação de um elevado percentual de células injuriadas durante o período correspondente à comercialização dos queijos Minas e Mussarela.

De um modo geral, ótimas condições para reparo das células parecem ocorrer entre pH 6 a 8, e temperatura de 20 a 40 °C em 1 a 3 horas. O tempo para este processo, ao que tudo indica, está relacionado com o tipo de tratamento subletal; assim, células congeladas se recuperam com 60 minutos, enquanto células submetidas ao calor e congeladas necessitam de um tempo de 3 horas (39,64,86). Além disso, as células injuriadas diferem nos locais e no grau de lesão, podendo, portanto, apresentar diferentes requerimentos de tempo e temperatura para o reparo. Um outro grande problema é que, quando se utiliza (como foi o caso) meio líquido para recuperação de células, as não injuriadas, sob as ótimas condições oferecidas, podem se multiplicar e aumentar as contagens. As condições de reparo, então, devem ser tais que os aumentos nas contagens no procedimento de enumeração seletiva seja somente decorrente do reparo e não também da multiplicação celular.

É fato constatado que as células injuriadas têm uma fase lag mais longa, quando comparada com as não injuriadas. Assim, a recuperação de células estressadas em meio líquido é traduzida pelo rápido aumento do número de células (ocorre um pico na

contagem) durante a recuperação, havendo a manutenção desta contagem até o final do período. Já no caso de multiplicação de células não estressadas, verifica-se um aumento gradual no número de células durante o período de recuperação. Em todos os estudos sobre recuperação de células estressadas subletalmente em meios de restauração líquidos, é recomendado verificar-se até que ponto a multiplicação de células não injuriadas ou células que tenham sido reparadas rapidamente, influenciam no aumento da contagem. Quando se utiliza reparo em meio sólido, como foi o caso do estudo de ZAYAITZ & LEADFORD (110), a situação é diferente, pois não há o risco descrito. Os pesquisadores verificaram que uma diferença de 25% entre contagens em meio não seletivo (Trypticase Soy agar) e seletivo (Trypticase Soy agar com 7% de NaCl), evidenciava injúria ácida em células de S. aureus.

São poucos os estudos com injúrias ácidas; portanto, para melhor compreensão e interpretação dos resultados, foi desenvolvido um experimento no qual inoculou-se células de S. aureus em leite contendo iniciador para iogurte, e acompanhou-se, durante 3 horas (uma amostragem por hora a partir do tempo zero), as contagens pelos dois métodos. No método de recuperação, a cada 30 minutos do período de reparo, avaliou-se a população de S. aureus, visando determinar o tempo de geração aproximado deste microrganismo, quando não submetido ainda a condição de "stress", e na presença de microflora láctica. Isto,

TABELA 7 - Contagens de S. aureus FRIA-100 (UFC/ml) e determinações de pH e acidez (% de ácido láctico) no meio de recuperação de S. aureus (caldo "CASOY"), utilizado para contagem com reparo de células estressadas, durante a produção de iogurte.

Tempo de fabricação do iogurte (h)	Análises	Tempo de recuperação (min)					Tempo de gerações (min)	Nº de gerações
		0	30	60	90	120		
0	pH	7,2	7,2	7,1	7,1	7,1	204	0,6
	Acidez	0,08	0,08	0,09	0,09	0,10		
	Contagem	$3,6 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$		
1	pH	7,2	7,2	7,2	7,1	7,0	36	3,3
	Acidez	0,09	0,09	0,09	0,10	0,12		
	Contagem	$3,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$		
2	pH	7,1	7,1	7,0	6,7	6,5	29	4,2
	Acidez	0,10	0,10	0,11	0,14	0,17		
	Contagem	$4,7 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$		
3	pH	6,9	6,9	6,8	6,6	6,0	43	2,8
	Acidez	0,14	0,14	0,15	0,19	0,24		
	Contagem	$3,9 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$		

para ter-se idéia sobre até que ponto o S. aureus poderia se desenvolver nas condições de reparo empregadas, que foi de 37 °C/2h em caldo "Casoy", na proporção de 1:10. Os resultados encontram-se na Tabela 7, e demonstram que :

a - A multiplicação de células normais ocorre durante o período de recuperação, podendo chegar a haver cerca de 4 gerações no período de 2 horas utilizado. Isto pode ser observado pelo aumento gradual das contagens neste período.

b - Como não havia ainda condições de "stress" para as células (baixa acidez e pH elevado), este aumento de contagens foi decorrente somente da multiplicação de S. aureus.

c - Diferenças entre contagens com e sem reparo celular de até 1,2 - 1,3 log, não são confiáveis como sendo recuperação de célula, pois podem ser decorrentes da multiplicação de células não estressadas.

Com relação às enumerações de S. aureus pelas duas metodologias, observa-se, para o queijo Minas (Figura 1) uma diferença significativa (de 1,62 log) entre as contagens, que posteriormente diminuiu ao começar a multiplicação celular. Grandes diferenças entre as contagens só foram novamente notadas a partir do décimo terceiro dia, quando se percebe claramente o início de uma redução acentuada no número de células de S.

aureus detectadas pela metodologia usual. Pela Tabela 2, pode-se verificar o percentual de células não detectadas, obtidas através da equação matemática descrita por RAY (84), bem como o contraste entre as médias das contagens obtidas pelos dois métodos. Percentuais acima de 94% de células não detectadas, provavelmente já demonstram a presença de recuperação de células injuriadas (diferenças maiores que 1,2-1,3 ciclos log).

Com efeito as maiores variações (acima de 96%), no queijo Minas, foram observadas no primeiro dia e após o décimo terceiro dia. No primeiro caso as injúrias sofridas pelas células através do processamento, que para este queijo pode ser decorrente da acidificação e salga, podem ter sido as causas da diferença. Com a posterior adaptação das células e com a multiplicação, as diferenças diminuem. Realmente não há sentido pensar-se em injúria (pelo menos em grandes porcentagens) sob condições que permitam uma multiplicação celular; isto leva a suspeitar, pelo tipo de técnica de recuperação utilizada, em multiplicação celular (e não recuperação) na etapa de incubação por 2 horas em caldo "Casoy". Na fase de declínio celular (condição estressante), aí sim, começou-se a ter células mortas, células viáveis sadias e células viáveis injuriadas. No entanto, estatisticamente, houve diferenças significativas entre as médias das contagens desde o primeiro até o vigésimo dia, a um nível de significância de 5%, possivelmente pela influência da grande amplitude das contagens.

Um quadro mais ou menos semelhante, entretanto, com algumas variações, ocorreu para o experimento com queijo Mussarela (Figura 2 e Tabela 3). Nos primeiros dias os percentuais de células não detectadas não foram tão elevadas (74,5% no primeiro dia e 91,9% no terceiro dia) e assim se mantiveram posteriormente, quando começou a haver uma multiplicação acentuada no número de S. aureus, que chegou ao máximo aos 18 dias. Neste período, a formação de "stress" não deve ter ocorrido, o que pode ser sentido pelos resultados. Os valores de pH e acidez não eram impeditivos, e houve um aumento de contagem da ordem de dois ciclos logarítmicos. A partir daí, começou a queda do número de S. aureus; entretanto, as variações entre os dois tipos de contagens não foram tão pronunciadas (pequeno percentual de células não detectadas). Somente a partir do vigésimo oitavo dia, variações maiores ocorreram, parecendo ser decorrentes de recuperação. Assim, ao que tudo indica, o quadro apresentado leva a crer que no início do experimento devido a injúrias de processo, no caso também térmica causado pela temperatura de filagem, há uma certa diferença entre as duas técnicas de contagem. Posteriormente, com a recuperação e adaptação de células e conseqüente multiplicação (ainda baixa acidez e pH elevado), houve uma ligeira diminuição da diferença entre as contagens. Desta forma, somente quando começa a ocorrer declínio da população de S. aureus (com conseqüente morte celular e formação de células estressadas), as diferenças aumentam sensivelmente. Estatisticamente, houve diferenças

significativas a um nível de 5% entre o quinto e vigésimo quarto dia (Tabela 3). A não significância observada após os 28 dias pode estar relacionada à baixas contagens pelos dois métodos em relação a amplitude total das contagens no experimento.

Em outro estudo sobre recuperação de S. aureus estressados, RAY (84) verificou que 67% de S. aureus submetidos ao congelamento e 59% expostos ao aquecimento não foram detectados em Manitol Salt agar (MSA), podendo estar injuriados. Esta pesquisa confirma que alguns compostos químicos presentes na formulação dos meios seletivos, embora possibilitando o desenvolvimento de células normais, exercem um pronunciado efeito inibitório sobre as células injuriadas. No caso do Baird-Parker agar, embora seja considerado como o mais eficiente dos meios seletivos para S. aureus, observa-se através dos resultados obtidos que ele exerce um certo efeito inibitório sobre as células submetidas ao estressamento ácido durante a maturação. A presença de telurito de potássio e cloreto de lítio em sua composição, considerados como sais tóxicos, foi provavelmente a causa, apesar de estar presente o piruvato, recomendado por BAIRD-PARKER & DAVENPORT (6), que tem a propriedade de degradar o peróxido de hidrogênio. Este fato, cria uma discrepância entre as contagens obtidas e o número real de organismos presentes.

Com relação aos resultados de amostras obtidas no comércio, pelo uso das duas metodologias (com e sem recuperação), observou-se uma incidência de diferenças superiores a 1,3 log (ou a um aumento na contagem superior a 94% após a recuperação, em 6 amostras (das 50 examinadas), de queijo Minas e em 12 amostras (das 50 analisadas) de Mussarela. Este fato parece, primeiramente, caracterizar que, em ambos os queijos, há diferenças entre as contagens pelos dois métodos, bem como real ocorrência de formação de célula estressada, demonstrada pelas grandes diferenças observadas (Anexo 4 e 5). O calor ao qual é submetido a massa, a maior acidez desenvolvida e o maior tempo de prateleira do queijo Mussarela, podem ter sido os fatores que justifiquem a maior frequência de contagens com grandes diferenças neste tipo de queijo. Outro fato que deve ser levado em conta é o tempo de comercialização dos queijos. É provável que maior parte das amostras examinadas fossem de queijos em que S. aureus estivesse na fase de multiplicação (sem formação de células estressadas, portanto), o que justifica o pequeno número de amostras com diferenças de contagens estipuladas como sendo realmente decorrente da formação de estresse. A grande incidência de contagens elevadas (maior que 10^4), reforçam esta possibilidade.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir, para os queijos produzidos nas condições descritas e para os comercializados na região de Lavras, que:

a. É evidente a possibilidade de multiplicação de S. aureus nos primeiros dias de comercialização, podendo atingir níveis de contagens capazes de provocar intoxicação alimentar, dependendo da contaminação inicial;

b. após cessar a multiplicação, começa a haver intensa redução do número de S. aureus durante o período de comercialização, enquanto que nos produtos lácteos, parecia estar relacionado com outros fatores presentes, além do pH. É conhecido que as bactérias lácticas podem inibir o S. aureus em queijos pelo efeito da diminuição do potencial redox, em combinação com o ácido láctico, pH e produção de outras substâncias inibidoras.

c. há possibilidade de formação de injúria subletal em S. aureus após ao processamento, e especialmente injúria ácida após

os níveis de acidez atingirem de 0,5 a 0,8% de ácido láctico;

d a técnica de contagem após recuperação em meio líquido empregada (recomendada por ORDAL et alii (75), possibilita intensa multiplicação de S. aureus, devendo, portanto, ser utilizada com restrições para os produtos estudados. Entretanto as diferenças superiores a 1,2-1,3 log entre as contagens com e sem recuperação, já são indicativas de que houve reparo de células injuriadas.

e. o processamento empregado e as condições de comercialização dos queijos Minas e Mussarela na região de Lavras, dão margem a uma elevada contagem inicial de S. aureus e posterior multiplicação do microrganismo no produto, o que constitui sério risco a Saúde Pública.

RESUMO

Foi estudado o comportamento de Staphylococcus aureus durante o período que corresponde a comercialização dos queijos Minas e Mussarela, bem como a possibilidade de formação de injúria neste microrganismo, em decorrência da acidez desenvolvida.

Os experimentos com inoculação foram feitos com S. aureus FRIA-100, adicionados ao leite cru para fornecer cerca de 10^6 cél/ml. As tecnologias utilizadas para o preparo dos queijos foram as tradicionais, sendo, entretanto, empregado o leite cru, prática largamente difundida na região de Lavras-Minas Gerais. As amostras foram estocadas a 7°C tendo sido o queijo Minas analisado por um período de 40 dias e o Mussarela por 60 dias. As análises, compreendendo a acidez, pH, contagem de S. aureus em agar Baird-Parker pela metodologia tradicional e pela metodologia recomendada por ORDAL et alii (75) para recuperação de células injuriadas, foram feitas em intervalos de 2-3 dias até o vigésimo dia para o queijo Minas e de 2-4 dias até o

vigésimo oitavo dia para o queijo mussarela, com menor frequência posteriormente.

Paralelamente, foi realizado um experimento visando avaliar a técnica de recuperação utilizada, para melhor interpretação dos resultados.

Finalmente, para verificar as diferenças de contagens entre as duas técnicas, a possibilidade de detecção de células injuriadas e as possíveis dificuldades de interpretação dos resultados, procedeu-se o exame de 50 amostras de queijo Minas e 50 amostras de queijo Mussarela do comércio de Lavras, Minas Gerais.

Os resultados mostraram que S. aureus FRIA 100 se multiplica nos primeiros dias de comercialização, chegando a aumentar dois ciclos logarítmicos. Após cessar o aumento das contagens (cerca de 5 dias para o Minas e 18 para o Mussarela), começa haver uma intensa redução do número de S. aureus, que pode chegar a ser de três ou quatro ciclos logarítmicos no final do período, em decorrência da acidez desenvolvida.

A formação de injúria é marcante, especialmente quando a acidez desenvolvida já é relativamente alta (0,7 a 0,8% de ácido láctico), ou seja, na fase de declínio das contagens. A técnica de recuperação em meio líquido recomendada por ORDAL et alii

(75). entretanto, não é adequada para enumeração de S. aureus nos produtos em pauta, pois possibilita, intensa multiplicação da bactéria. Deve, portanto, ser empregada com restrições. A segurança de que o aumento da contagem foi decorrente do reparo celular só ocorre, quando a diferença entre a enumeração pelas duas metodologias for superior a 1,3 log, para os produtos estudados.

SUMARY

The growth behaviour of Staphylococcus aureus in fresh cheese ("Minas" cheese) and Muzzarela during their shelf-life was studied in this research. It was also investigated the possibility of injury in this microorganism caused by increasing of acidity.

Raw milk was inoculated with approximately 10^6 cels/ml of S.aureus FRIA-100. The cheese production was performed according to normal procedures; however, raw milk was used as starting material because it is the usual cheese processing carried out in the area of Lavras-MG.

Cheese samples of "Minas" cheese and Muzzarela were stored at 7 °C for 40 and 60 days, respectively. During this time, each 2 or 4 days intervals, the following analysis were developed: acidity, S. aureus counting using agar Baird-Parker by the traditional method and by the method recommended by the American Public Health Association ORDAL et alii (75) to count with

repair of injured cels. After 20 day storage for "Minas" cheese and 38 day storage for Muzzarela the frequency sampling was decreased.

To verify the difference between the traditional S. aureus counting and ORDAL et alii (75) method, 50 samples of both cheeses were collected in dairy stores of Lavras-MG.

The results showed that S. aureus FRIA-100 grow very fast (two log cycles) during the inicial days and started to decrease intensively after 5 days for "Minas" cheese and 18 day for Muzzarela, caused by the development of acidity. The redution in number, after the higher count, reached 3 to 4 log cycles.

When acidity was in the range of 0,7 to 0,8%, expressed in lactic acid, the presence of injured S. aureus could be detected in high amounts.

The ORDAL et alii (75) of technique to repair injured cels was not adequated to counting S. aureus in the products studied in this research, because it made possible high growth rates of S. aureus. As a result, this technique might be used with restrictions. The comparation between the two methods permits the conclusion that only when, ORDAL et alii (75) counting technique with repair was 1,3 log cycle higher then the traditional there was secure indication of injured S. aureus were present in the cheeses.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAR, F.M.; MOHAMMED, M.T. & ARSLAIN, S.H. Selected biological properties of enterotoxigenic Staphylococci isolated from milk. Journal of Food Protection, Ames, 49 (11):871-3, Nov. 1986.
2. ALCALÁ, M; MILLAN, M.J; MARCOS, A; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J; & ESTEBAN, M.A. Actividad del agua y pH de algunos quesos españoles. Alimentaria, Madrid, 175:41-3, set. 1986.
3. ANDREW, W.H. Resuscitation of injured Salmonella spp. and coliformes from foods. Journal of Food Protection, Ames, 49(1):62-75, Jan. 1986.
4. ARAUJO, W.P.de. Staphylococcus aureus em leite cru. Produção de enterotoxina e caracterização da origem provável, humana ou bovina, a partir das cepas isoladas. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, 1984. 119p. (Tese de Doutorado).

5. BAIRD-PARKER, A.C. Organic acids. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. Microbial Ecology of foods; factors affecting life and death microorganisms. New York, Academic Press, 1980. v.2, p.126-35.
6. ----- & DAVENPORT, E. The effect of recovery medium on the isolation of Staphylococcus aureus after heat-treatment and after storage on frozen or dried cells. Journal Applied Bacteriology, Washington, 28:390-402, 1965.
7. BARNARD, E.A. Ribonucleases. Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, 38:677, 1969.
8. BEUCHAT, L.R. Injury and repair of gram negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. Advance in Applied Microbiology, London, 23:219-43, 1978.
9. BLANKENSHIP, L.C. Some characteristics of acid injury and recovery of Salmonella bareilly in a model system. Journal of Food Protection, Ames, 44(1):73-7, Jan. 1981.
10. BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) Decreto Nº 1225 de 25-06-72. Brasília, 1972.

11. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes; I. Métodos microbiológicos. Brasília, 1981. 219p.
12. BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. A embalagem de Alimentos no Brasil. Programa adequação, Série alimentos, Brasília, 1984. 50p.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Ofício Circular SNVS/DINAL/BSB/Nº 007, Brasília, 25 de fevereiro de 1987. 20p.
14. BRYAN, F.L. Epidemiology of Milk-Borne Diseases. Journal of Food Protection, Ames, 46(7):637-49, July, 1983.
15. BUCKER, E.R; MARTIN, S.E; ANDREWS, G.P & ORDAL, Z.J.
Effect of hydrogen peroxide and sodium chloride on enumeration of thermally stressed cells of Staphylococcus aureus. Journal of Food Protection, Ames, 42:961-4, 1979.
16. BUSTA, F.F. Introduction to injury and repair of microbial cells. Advance Applied Microbiology, London, 23:195-201 1978.

17. ----- . Practical implications of injured microorganisms in food. Journal Milk Food Technology, Ames, 39 (2):138-45, Feb. 1976.
18. CARLSSON, J.; NYBERG, G. & WRETHÉN, J. Hydrogen peroxide and superoxide radical formation in anaerobic broth media exposed to atmospheric oxygen. Applied Environmental Microbiology, Washinton, 36:223-9, 1978.
19. D'AOUST, J.Y. Recovery of sublethally heat-injured Salmonella typhimurium on supplemented plating media. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 35 (3):483-6, Mar. 1978.
20. DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M; EIROA, M.N.U & VALLE, J.L.E. Desenvolvimento de Staphylococcus aureus e produção de enterotoxina em queijo tipo Minas. Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 9:163-74, 1978.
21. EL-BANNA, A.A. & HURST, A. Survival in foods of Staphylococcus aureus grown under optimal and stressed conditions and the effect of some food preservatives. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 29:297-302, 1983.

22. FLOWERS, R.S.; MARTIN, S.E.; BREWER, D.G. & ORDAL, Z.J. Catalase and enumeration of stressed Staphylococcus aureus cells. Applied Environmental Microbiology, Ames, 33:1112-17, 1977.
23. GALLO, C.R. Estudo da microflora de derivados do leite como índice de qualidade. Piracicaba, ESALQ, 1978. 93p. (Tese de MS).
24. GARCIA, M.L.; MORENO, B. & BERGDOLL, M.S. Characterization of Staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. Applied and Environmental Microbiology, Washinton, 39(3): 548-53, Mar. 1980.
25. GAYA, P.; MEDINA, M.; BAUTISTA, L. & NUNES, M. Influence of latic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on Staphylococcus aureus behaviour in mache-go cheese. International Journal of Food Microbiology, Washinton, 6:249-257, 1988.
26. GHOSH, S.S. & LAXIMINARAYANA, H. Incidence and distribution of staphylococci in milk and milk products. Indian Journal of Animal Health, India, 13(2):117-20, 1974.
27. GOEPFERT, J.M. & HICKS, R. Effect of volatile fatty acids on Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology, Baltimore, 97(2):956-57, Feb. 1969.

28. GOMEZ, R. C. ; CARVALHO, E.P. de & COSTA, L.C.G. Condições microbiológicas de queijo "minas frescal" comercializados em Lavras - MG. Ciência e Prática, Lavras, 7(2):111-21, jul./dez. 1983.
29. GOMÉZ, R. F. Nucleic acid damage in thermal inactivation of vegetative microorganisms. Advance Biochemistry Engineering, Berlin, 5:49-67, 1977.
30. GRAY, R. J. H., GASKE, M.A. & ORDAL, Z.J. Enumeration of thermally stressed Staphylococcus aureus MF 31. Journal Food Science, Chicago, 39 (4):844-6, July/Aug. 1974.
31. GRAY, R.J.H.; WITTER, L.D. & ORDAL, Z.J. Characterization of mild thermal stress in Pseudomonas fluorescens and its repair. Applied Microbiology, Baltimore, 26:78-85, 1973.
32. HARMON, S.M & KAUTTER, D.A. Beneficial effect of catalase treatment on growth of Clostridium perfringens. Applied Environmental Microbiology, Baltimore, 32:402-416, 1976
33. HARTMAN, P.A. Modification of conventional methods for recovery of injured coliforms and Salmonellae. Journal of Food Protection, Ames, 42:356-61, 1979.

34. HENDRICKS, S.L.; BELKNAP, R.A. & HAUSLER, W.J. Staphylococcal food intoxication due to cheddar cheese; I. Epidemiology. Journal Milk Food Technology, Ames, 22:313-7, 1959.
35. HITCHNER, B.J.; GRAU, F.H.; & EGAN, A.F. Significance of the cell envelope in thermal death of Escherichia coli. Proceedings of the Australian Biochemistry Society, Melbourne, 8:73, 1975.
36. HOBBS, B.C. Food poisoning: observations on sources of Salmonellae, Clostridium perfringens and Staphylococci. Annales del Institute Pasteure Lille, 15:31-41, 1974.
37. HOBBS, B.C. & JR. OLSON, J.C. Symposium on the restoration of sublethally impaired bacterial cells in foods; I. Introduction. Journal Milk Food Technology, Ames, 34(11): 548-52, Nov. 1971.
38. HOLZAPFEL, W.H. & MOSTERT. A microbiological study of South African gouda cheese; II. Chemical aspects and the occurrence of non-lactic acid bacteria. Journal Dairy Technology, South African, 5:203-7, 1973.
39. HURST, A. Bacterial injury: a review. Canadian journal of Microbiology, Canada, 23(8):935-42, Aug. 1977.

40. ----- Injury and its effect on survival and recovery,
In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microbial Ecology of food; factors affecting life and death of microorganisms. New York Academic Press, 1980. v.1, p.205-14.
41. -----; HUGHES, A.; BEARE-ROGERS, J.L. & COLLINS-THOMPSON, D.L. Physiological studies on the recovery of salt tolerance by Staphylococcus aureus after sublethal heating. Journal of Bacteriology, Baltimore, 116:901-7, 1973.
42. -----; HUGHES, A. & COLLINS-THOMPSON, D.L. The effect of sublethal heating on Staphylococcus aureus at different physiological ages. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 20:765-8, 1974.
43. IANDOLA, J.J. & ORDAL, Z.J. Repair of thermal injury of Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology, Baltimore, 91:134-142, 1966.
44. IBRAHIM, G.F. Inhibition of S. aureus under simulated cheddar cheese making conditions. Australian Journal Dairy Technology, Australia, 33:102-8, 1978.

45. -----; RADFORD, D.R.; BALDOCK, A.K. & IRELAND, L.B.
Inhibition of growth of Staphylococcus aureus and enterotoxin production in cheddar cheese produced with induced starter failure. Journal of Food Protection. Ames, 44(3): 189-93, Mar. 1981.
46. JANSSEN, D.W. & BUSTA, F.F. Repair of injury in Salmonella anatum cells after freezing and thawing in milk. Criobiology, New York, 10:386-92, Oct. 1973.
47. JONES, R.H. & BENNETT, F.W. Bacteriophage types and antibiotic sensitivity of staphylococci from bovine milk and human nares. Applied Microbiology, Baltimore, 13:725-31, 1983.
48. JUANITO, C. Jr.; BARROS, G.A.; VIDIGAL, C.F.D. & GOMES, A. K. Abordagem do INDI sobre os problemas e soluções relativo ao setor de laticínios de Minas Gerais. Belo Horizonte, INDI, 1978. n-349.
49. KAFEL, S. Effects of preenrichment media and their incubation conditions on isolating Salmonellae from fish meal. Journal of Food Protection, Ames, 44(4):268-70, Apr. 1981.

50. KHAYAT, F.A.; BRUHN, J.C. & RICHARDSON, G.H. A survey of coliforms and Staphylococcus aureus in cheese using impedimetric and plate count methods. Journal of Food Protection, Ames, 51(1):53-5, Jan. 1988.
51. KLEIN, D.A. & WU, S. Stress: a factor to be considered in heterotrophic microorganism enumeration from aquatic environments. Applied Microbiology, Baltimore, 27:429-31, 1974.
52. LEITÃO, M.F. de F.A. Injúria microbiana e sua importância na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos. Boletim do Instituto tecnológico de Alimentos, Campinas, 22(4):397-76, out./dez. 1985.
53. LICCIARDELLO, J.T.; NICKERSON, J.T.R. & GOLDBLITH, S.A. Recovery of Salmonelae from irradiated and unirradiated foods. Journal of Food Protection, Ames, 35:620-4, 1970.
54. MANDIL, A & MORAIS, V.A.D. Staphylococcus aureus em queijo tipo "Minas". Ciência Tecnologia de Alimentos, 2(2):233-41, 1982.

55. MARTIN, S.E.; FLOWERS, R.S. & ORDAL, Z.J. Catalase: its effect on microbial enumeration. Applied Environmental Microbiology, Washinton, 32:731-4, 1976.
56. MATCHES, J.R. & LISTON, J. Effect of pH on low temperature growth of Salmonella. Journal Milk Food Technology, Ames, 35:49-52, 1972.
- 57 MCDONALD, J.S. Streptococcal and staphylococcal mastitis. Journal of the American Veterinary Medical Association, Chicago, 170:1157-9, 1977.
58. MCDONALD, L.C.; HACKNEY, R.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.
59. MINAS GERAIS. Secretaria de Estado do Planejamento e Coordenação Geral. Anuário Estatístico de Minas Gerais 1983-1984. Belo Horizonte, 1984. v.5.
60. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxication. A Review III. Staphylococcal in dairy products. Journal Milk Food Technology, Ames, 35:77-82, 1972.

61. MORICHI, T. Metabolic injury in frozen Escherichia coli.
In: NEI, T. Freezing and Drying of Microorganisms.
Baltimore, University Park Press, 1969. 53p.
62. MOSS, C.W. & SPECK, M.L. Identification of nutritional components in trypticase responsible for recovery of Escherichia coli injured by freezing. Journal of Bacteriology, Baltimore, 91:1098, 1966.
63. ----- & ----- . Realise of biologically active peptides from Escherichia coli at subzero temperatures. Journal of Bacteriology, Baltimore, 91:1105, 1966.
64. MOSSEL, D.A.A. ; & CORRY, J.E.L. Detection and enumeration of sublethally injured pathogenic and index bacteria in foods and water processed for safety. Alimenta-Sonder. Ausgabe, 5:19-34, 1977.
65. -----; VELDAMAN, A. & ELDERINX, I. Comparison of the effects of liquid medium repair and the incorporation of catalase en MacConkey type media on recovery of enterobacteriaceae sublethally stressed by freezing. Journal Applied Bacteriology, Washington, 49(3):405-9, Dec. 1980.
66. MULLER, F.J. Food poisoning from staphylococcal enterotoxins in cheese. XIX INT. DAIRY CONGRESS, 1E:552, 1974.

67. NAGUIB, M.M.; NOUR, M.A. & NOAMAN, A.A. Survival of Staphylococcus aureus in Ras Cheese. Archiv Für Lebensmittelhygiene, Egypt, 30(6):227-8. Nov./Dez. 1979.
68. NISKANEN, A & KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. Journal of Food Protect, Ames, 40:543-8, 1977.
69. NOLETO, A.L. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal enterotoxin production in the presense of non-enterotoxigenic staphylococci. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 39(6): 1167-71, June. 1980.
70. NORTH, W.R. Lactose pre-enrichment method for isolation of Salmonellae from dried egg albumen. Applied Microbiology, Baltimore, 9:188-95, 1961.
71. NUNHEIMER, T.D. & FABIAN, F.W. Influence of organic acids, sugars, and sodium chloride upon strains of food poisoning staphylococci. American Journal Public Health, New York, 30:1040-9, 1940.
72. OLIVEIRA, J.S.de. Fabricação dos principais queijos. In: Queijos-Fundamentos tecnológicos. São Paulo. Icone, 6: 105-137, 1986. 146p.

73. OLSON, J.C.; CASMAN, E.P.; MAER, E.F. & STONE, E.J. Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. Applied Microbiology, Baltimore, 20: 605-7, 1970.
74. ORDAL. Z.J. III. Influence of thermal stress In: SYMPOSIUM ON THE RESTORATION OF SUBLETHALLY IMPAIRED BACTERIAL CELLS IN FOODS. Journal Milk Food Technology, Ames, 34 (11): 549-50, 1971.
75. -----; IANDOLO, J.J.; RAY, B. & SINSKEY, A.G. Detection and enumeration of injured microorganisms. In: COMPENDIUM OF METHODS FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS Washington, APHA, 1976. cap.7, p.163-9.
76. OTERO, A.; GARCÍA, M.C.; GARCÍA, M.L. & MORENO, B. Effect of growth of a commercial starter culture on growth of Staphylococcus aureus and Termonuclease and enterotoxins (C1 and C2) production in broth cultures. International Journal of Food Microbiology, Ames, 6:107-114, 1988.
77. PELLON, J.R. SANZ, B. & GOMEZ, R.F. Daño térmico y viabilidad celular en bacterias. Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos, España, 21(2):211-21, 1981.

78. PIERSON, M.D. & ORDAL, Z.L. The transport of methyl-1-D-glucopyranoside by termally stressed Salmonella typhimurium. Biochemical and Biophysical Research communications, London, 43:378-83. 1971.
79. PIMENTEL, G.G. Curso de estatística experimental. 11 ed. Piracicaba, Nobel, 1980. v.1, 430p.
80. POSTGATE, J.R. & HUNTER, J.R. On the survival of frozen bacteria. Journal General Microbiology, Cambridge, 26: 367, 1961.
81. PREGNOLATTO, W. & PREGNOLATTO, N.P. Coord. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo, Imprensa Oficial de Estado, IMESP, 1985. v.1, 533p.
82. PRZYBYLSKI, K.S. & WITTER, L.D. Injury and recovery of Escherichia coli after sublethal acidificacion. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 37(2):261-5, Feb. 1979.
83. RAY, B. Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future. Journal of Food Protection, Ames, 49(8):651-55, Aug. 1986.

84. ----- . Methods to detect stressed microorganisms. Journal of Food Protection, Ames, 42(4):346-55, Apr. 1979.
85. RAY, B & ADAMS JR, D.M. Repair and Detection of injured microorganisms. In: COMPENDIUM OF METHODS FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. Washington, Apha, 1984. cap. 7, p.112-23.
86. ----- & SPECK, M.L. Freeze-injury in bacteria. Critical Reviews in clinical Laboratory Science, Cleveland, 4(8):161-212, Aug. 1973.
87. RAYMAN, M.K.; ARIS, B. & EL-DEREA, H.B. The effects of compounds with degrade hydrogen peroxide on the enumeration of heat stressed cells of Salmonella seufftenberg. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 24:883-5, 1978
88. READ JUNIOR, R.B.; PRITCHARD, W.L. & DONNELLY, C.B. Assay of Staphylococcal enterotoxin in milk by immunodifusion. Journal of Dairy Science, Champaing, 46(6):598-99, June 1963.
89. REITER, B.; FEWINS, B.G.; FVYER, T.F. & SHARPE, E.M. Factors affecting the multiplication and survival of coagulase positive Staphylococci in cheddar cheese. Journal Dairy Research, London, 31:261, 1964.

90. REYNOLDS, A.C. The mode of action of acetic acid on bacteria. Dissertation Abstracts International, London, 35 (10):4935B, Apr. 1978.
91. RICHARDSON, G.H. & DIVAHIA, M.A. Lactic culture inocula required to inhibit Staphylococci in sterile milk, Journal of Dairy Science, Champaign, 56:706-9, 1973.
92. ROSE, R.E. & LITSKY, W. Enrichment procedure for use with the membrane filter for the isolation and enumeration of fecal streptococci in water. Applied Microbiology, Baltimore, 13:106-8, 1965.
93. ROTH, L.A. & KEENAN, D. Acid injury of Escherichia coli. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 17(8):1005-8, Aug. 1971.
94. SANTOS, E.C. dos. & GENIGEORGIS, C. Survival and grow of Staphylococcus aureus in commercially manufactured brasilian Minas cheese. Journal of Food Protection. Ames, 44 (33):177-84, Mar. 1981.
95. SANTOS, E.C. dos; GENIGEORGIS, C. & FARVER, T. B. Prevalence of Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of brasilian minas cheese. Journal of Food Protection, Ames, 44(3): 172-7, Mar. 1981.

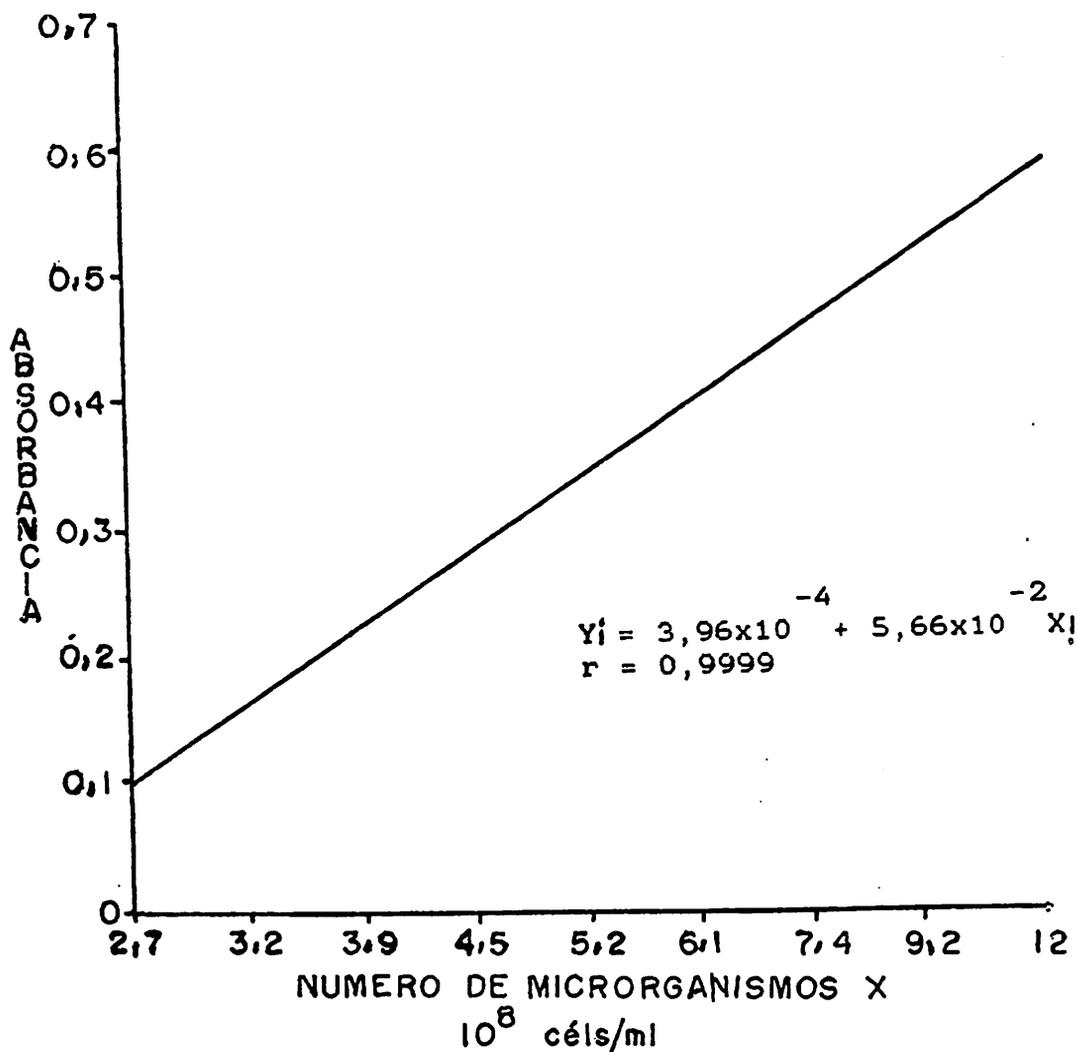
96. SCHEUSNER, D.L.; HOOD, D.L. & JARMON, L.G. Effect of temperature and pH on growth and enterotoxin production by Staphylococcus aureus. Journal Milk of Food Technology, Ames, 36:249-52, 1973.
97. -----; TIBANA, A. & NAYLON, M.B. Estudo microbiológico do queijo tipo Minas frescal, consumido na cidade do Rio de Janeiro; In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 10, Rio de Janeiro, 1979. Anais... Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1979. p.15-38.
98. SIPKA, M.; SOJANOVIC, J. & KALEMBER, M.R. Comparative evaluation of three media used for the detection of Staphylococci in cheese. Acta Veterinária, Budapest, 26:57-63, 1976.
99. STADHOUDERS, J.; CORDES, M.M. & VAN SCHOUWENBURG-VAN FOEKEN A.W.J. The effect of manufacturing conditions on the development of staphylococci in Cheese. Their inhibition by starter bacteria. Netherland Milk Dairy Journal, Netherland, 32:193-203, 1978.
100. STRAKA, R.P. & STOKES, J.L. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. Journal of Bacteriology, Washington, 78:181-5, 1959.

101. SVEUM, W.H. & DRAFT, A.A. Recovery of Salmonellae from foods using a combined enrichment technique. Journal of Food Science, Chicago, 46:94-9, 1981.
102. TATINI, S.R. Production of Staphylococcal enterotoxin A in blue, brick, Mozzarella and swiss cheese. Journal Dairy Science, Swiss, 56:429-35, 1973.
103. -----; JEZESKE, J.J.; MORRIS, H.A.; OLSON, J.C. & CASMAN E.P. Production of Staphylococcal enterotoxin A in cheddar and colby cheeses. Journal Dairy Science, Washington, 54(6):815-825, June, 1971.
104. THATCHER, F.S.; SIMON, W. & WALTERS, C. Extraneous matter and bacteria of public health significance in cheese. Canadian Journal of Public Health, Canada, 47:234-43, 1956.
105. TOMLINS, R.L.; PIERSON, M.D.; & ORDA, Z.J. Effect of thermal injury on the TCA cycle enzymes of Staphylococcus aureus MF 31 and Salmonella Typhimurium 7136. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 17:759-65, 1971.
106. UNTERMANN, F. Mastitis-Staphylokokkin and enterotoxin; In: 6th. INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF W.A.V.F.H. Elsinove, Denmark, 1973.

107. VAN NETTEN, P.; VEN DER ZEE, H. & MOSSEL, D.A.A. A note on catalase enhanced recovery of acid injured cells of gram negative bacteria and its consequences for the assessment of the lethality of L-lactic acid decontamination of raw meat surfaces. Journal of Applied Bacteriology, Washington, 57(1):169-173, Jan. 1984.
108. WILSON, D. Pesquisa de Staphylococcus aureus em leite a ser pasteurizado. Revista de Saúde Pública, São Paulo, 11:1-17, 1974.
109. WITTER, L.D. & ORDAL, Z.J. Stress effects and food microbiology; In: WOODBINE, M. Antibiotics and antibiosis in agriculture. London, Ed. Butterworths, 1977. P.131-138
110. ZAYAITZ, A.E.K. & LEDFORD, R.A. Characteristics of acid-injury and recovery of Staphylococcus aureus in a model system. Journal of Food Protection, Ames, 48(7):616-20, July, 1985.
111. -----; & ZEHREN, V.F. Relation of acid development during cheesemaking to development of Staphylococcal enterotoxin A. Journal of Dairy Science, Champaign, 51(5):635-9, May, 1968.

A N E X O S

Anexo 1. Reta que relaciona as contagens de S. aureus (cepa FRIA-100) em meio Baird-Parker agar com as leituras em absorbância da suspensão.



Anexo 2. Análise de variância - Fatorial A x B - Inteiramente casualizado.

Contagens S. aureus em queijos Minas inoculado

FV	GL	SQ	QM	F	PROB. F
MÉTODOS	1	24660152,0767	24660152,0767	128,5340	0,0000
TEMPOS	10	31243850,7141	3124385,0714	16,2849	0,0000
MÉT. TEM	10	5164521,0564	516452,1056	2,6919	0,0115
RESÍDUO	44	8441726,5620	191857,4219		
TOTAL	65	69510250,4092			

MÉDIA= 1040 CV= 42,10%

TESTE DE TUKEY (5%) - MÉTODOS

ORDEM	TRAT	MÉDIA	CONTRASTE
1	2	1651,77	a
2	1	429,23	b

Q = 2,85182 DELTA = 217,447

Anexo 3. Análise de variância - fatorial A x B - Inteiramente casualizado
 Contagens de S. aureus em queijo Mussarela no período de comercialização e estocagem

FV	GL	SQ	QM	F	PROB F
TEMPO	14	72396132184,3057		7171152398,8790	
139,9400					
MÉTODO	1	7415235853,9092		7415235853,9092	
339,5120					
TEM.MÉT	14	7649422795,6958		46387342,5497	37,9280
0,0000					
RESÍDUO	60	73382221,4757	1223037,0246		
TOTAL	89	73534173055,3864			

MÉDIA = 4332,8564 CV = 25,52%

TESTE DE TUKEY (5%) - MÉTODO

ORDEM	TRAT	MÉDIA	CONTRASTE
1	2	6480,82	a
2	1	2184,9	b

Q = 2,83

DELTA = 466,552

Anexo 4. Análise de variância - fatorial A x B - Blocos casualizados.
Contagens de S. aureus Em queijo Minas frescal do Comércio.

FV	GL	SQ	QM	F	PROB F
BLOCO	9	9719130,1157	1079903,3462	1,7854	0,0833
MARCAS	4	17406808,3500	4351702,0875	7,1948	0,0001
MÉTODOS	1	9769656,7607	9769656,7607	16,1525	0,0003
MAR. MÉT	4	6323225,7180	1580806,4295	2,6136	0,0406
RESÍDUO	81	48991925,6362	604838,5888		

TOTAL 99 92210746,6362

MÉDIA = 551,9194 CV = 140,91 %

TESTE DE TUKEY (5%) - MARCAS

ORDEM	TRAT	MÉDIA	CONTRASTE
1	5	1266,890	a
2	2	624,878	ab
3	4	601,006	ab
4	1	157,176	b
5	3	109,648	b

Q = 3,94889 DELTA = 686,72

TESTE DE TUKEY (5%) - MÉTODOS

ORDEM	TRAT	MÉDIA	CONTRASTE
1	2	864,484	a
2	1	239,355	b

Q = 2,81444 DELTA = 309,548

Anexo 5. Análise de variância - fatorial A x B - Blocos casualizados.
Contagem de S. aureus em queijo Mussarela - comércio

FV	GL	SQ	QM	F	PROB F
BLOCO	9	16018862,7064	1779873,6340	2,5170	0,0135
MARCAS	4	12887288,5094	322182,1274	4,5561	0,0026
MÉTODOS	1	11569908,0709	11569908,0709	16,3615	0,0003
MAR. MÉT	4	4173733,0494	1043433,4873	1,4756	0,2162
RESÍDUO	81	57278419,0555	707140,9754		
TOTAL	99	101928212,2415			

MÉDIA = 551,9194 CV = 140,91 %

TESTE DE TUKEY (5%) - MARCAS

ORDEM	TRAT	MÉDIA	CONTRASTE
1	1	1026,55	a
2	4	829,652	ab
3	3	771,222	ab
4	5	214,65	b
5	2	118,147	b

Q = 3,94889 DELTA = 742,528

TESTE DE TUKEY (5%) - MÉTODOS

ORDEM	TRAT	MÉDIA	CONTRASTE
1	2	932,19	a
2	1	251,899	b

Q = 2,81444 DELTA = 334,704