

ANGELA SINGUI MARQUES GUIMARÃES RIBEIRO

COLIFORMES EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL:
AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
ENUMERAÇÃO E ISOLAMENTO

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

Singui

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

1 9 8 1



B [REDACTED]
[REDACTED]
N.º CLAS [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
N.º REG. [REDACTED]
DATA [REDACTED]

ANGELA RINGUI MARQUES GOIMARAES RIBEIRO

COLIFORMES EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL:
AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
ENUMERAÇÃO E ISOLAMENTO

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

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

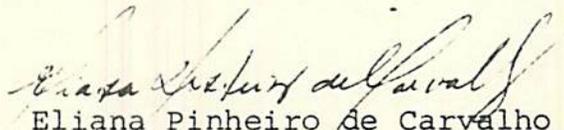
1981

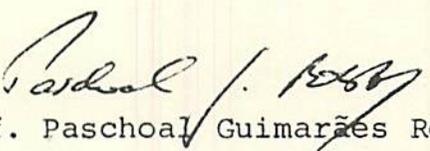
~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~
N.º REG. _____
DATA _____

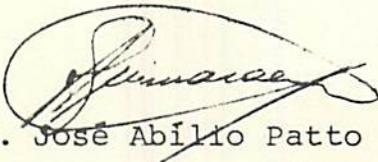


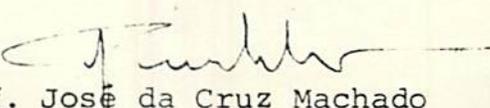
COLIFORMES EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL: AVALIAÇÃO DE
METODOLOGIAS PARA ENUMERAÇÃO E ISOLAMENTO

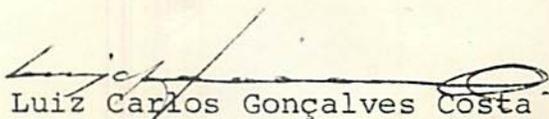
APROVADA:


Prof.^a Eliana Pinheiro de Carvalho
Orientadora


Prof. Paschoal Guimarães Robbs


Prof. José Abílio Patto Guimarães


Prof. José da Cruz Machado


Prof. Luiz Carlos Gonçalves Costa

Aos meus pais SYLVIO e ELY
por terem propiciado as
condições básicas para
que eu seguisse este
caminho.

Aos meus irmãos DEISE e RODOLFO
pelo incentivo.

Ao meu esposo DINAMIR pela
profundidade e sinceridade
de sua compreensão.

A tia Maria pelo exemplo
de vida

DEDICO

BIOGRAFIA

ANGELA SINGUI MARQUES GUIMARÃES RIBEIRO, filha de Sylvio Marques Guimarães e Ely Singui Marques Guimarães, nasceu no dia 23 de setembro de 1951, no Estado do Rio de Janeiro.

Seus estudos de 2º grau tiveram início em 1968 e foram realizados no Colégio Técnico de Economia Doméstica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em 1971, ingressou no curso de Graduação em Ciências Domésticas, da mesma Universidade, tendo-o concluído em 1974.

Em 1975, foi contratada pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro iniciando suas atividades de ensino e extensão junto ao Departamento de Economia do Lar, do Instituto de Ciências Humanas e Sociais.

Em fevereiro de 1979, ingressou no Curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, onde iniciou seu experimento de tese em março de 1981, tendo concluído o curso em outubro do mesmo ano.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, representada pelo Departamento de Economia do Lar/Instituto de Ciências Humanas e Sociais, bem como ao Plano Institucional de Capacitação de Docentes-PICD/CAPES/UFRRJ, pela oportunidade concedida para a realização do curso e pela concessão do período de prorrogação necessário a seu término.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras-ESAL, através do Departamento de Ciências dos Alimentos-DCA que, no decorrer do curso, proporcionou um clima favorável de entrosamento.

À Professora e Pesquisadora Eliana Pinheiro de Carvalho pelo estilo de sua orientação, reunindo a eficiência, a amizade e a presença constante nas diferentes etapas deste meu primeiro trabalho científico.

Aos professores integrantes da Banca Examinadora, pelas valiosas sugestões.

Aos Professores Custódio Donizete dos Santos, Joaquim dos Santos Penoni e Roussauliere Mattos, do Departamento de Química da ESAL, pelo atendimento atencioso quer quanto aos esclarecimentos de natureza química ou ao fornecimento de reagentes.

Ao Instituto Oswaldo Cruz/RJ, pela identificação de algumas cepas.

Aos Professores Vitor Francisco Schuch Jr. e Maria Dutra da Silva Sanavria, da Universidade Federal de Santa Maria/RS, por terem me introduzido no mundo de Carl Rogers e me ensinado o aprendizado da autenticidade no relacionamento interpessoal.

Aos Professores Abner Chiquieri (UFRRJ), Paulo Cesar Lima (ESAL) e à Biblioteconomista Maria Aparecida de Carvalho e Silva (ESAL), pela colaboração no português, estatística e citação bibliográfica, respectivamente.

À amiga, Professora Maria de Fátima Píccolo, que não mediu esforços para colaborar comigo na diversidade de favores que lhe solicitei, bem como pela grandiosidade dos momentos partilhados.

Ao colega de turma, o amigo Vilson Alves de Góis, por ter acreditado em mim, valorizado minhas idéias e me ajudado a refletir.

À colega de turma, Maria Teresa Costa Esteves, pelo incentivo e por ter dividido comigo a alegria de sua presença.

Ao monitor do DCA/Microbiologia de Alimentos, Osmino Faria Lopes e à laboratorista Eliane Mara Carvalho Alcântara, por

terem prestado colaboração durante as repicagens, preparo de meios de cultura e vidrarias.

A Arlete Souza Guimarães e Maria Lucia Mendes Alves pe los serviços de datilografia do material semi concluído.

Aos amigos Aduino Barcelos, Angelo Góes, Delvaí de Mu rilo, Eduardo Rando, Eduardo Colombo, José Belisário, José Guares qui, José Marcelo Grillo, José Unaldo Silva, Manoel Machuca Neto, Maria de Lourdes dos Santos, Maria Edna Silva, Maria Zuleide de Negreiros, Mighel Lôpes, Miriam Gomide, Myriane Scalco, Nelson Fi lho, Ricardo Pereira, Scheilla Bragança e Sonia Alfaia, a alguns por terem me acompanhado ao Laboratório nos horários fora do expe diente, a todos por terem transformado a minha passagem pela cida de de Lavras numa época de momentos enriquecedores e inesquecí veis.

Àqueles colegas das turmas de 1979 a 1981 que tive a oportunidade de conhecer, conviver e trocar idéias.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
LISTA DE TABELAS -----	viii
LISTA DE QUADROS -----	xii
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	6
2.1. O Grupo Coliforme -----	6
2.2. Coliformes Fecais como Indicadores de Contami nação -----	8
2.3. Metodologia para Isolamento, Enumeração e Dife renciação -----	13
2.3.1. Isolamento e Enumeração - Número Mais Provável (NMP) e Contagem Direta em Placas (CDP) -----	13
2.3.2. Diferenciação entre Coliformes Fecais e Não Fecais -----	21

3.	MATERIAL E MÉTODOS -----	29
3.1.	Caracterização Geral do Ensaio e Técnicas Testadas -----	29
3.2.	Cômputo da Densidade Populacional -----	32
3.3.	Preparo da Amostra -----	33
3.4.	Esquema de Isolamento e Provas Bioquímicas ----	33
3.5.	Tratamento Estatístico -----	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	36
4.1.	Coliformes Totais -----	36
4.2.	Coliformes Fecais -----	47
4.3.	Condições Higiênico Sanitárias do Queijo Minas Frescal (Coliformes Totais x Coliformes Fecais)	60
5.	CONCLUSÕES -----	63
6.	RESUMO -----	66
7.	SUMMARY -----	69
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	72
	APÊNDICE -----	84

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
1	Valores médios da enumeração de coliformes totais após incubação de 48 horas em três meios líquidos (NMP) e 24 horas em dois meios sólidos (CDP) -----	37
2	Número de tubos positivos após 24 e 48 horas de incubação, de acordo com três meios líquidos (NMP) testados para a enumeração de coliformes totais -----	39
3	Culturas isoladas dos diferentes meios líquidos (NMP/48 horas) e sólidos (CDP/24 horas) utilizados no teste presuntivo para o grupo coliformes totais -----	41
4	Freqüência do isolamento de <i>Escherichia coli</i> por diferentes meios líquidos (NMP/48 horas) e sólidos (CDP/24 horas) para a enumeração do grupo coliformes totais nas dez amostras de queijo analisadas -----	45

TabelaPágina

5	Freqüência do isolamento de microrganismos recuperados de 3 meios líquidos (NMP/48 horas) e 2 sólidos (CDP/24 horas) para a enumeração do grupo coliformes totais -----	46
6	Valores médios de contaminação fecal obtidos através de diferentes técnicas de enumeração do grupo coliformes fecais -----	48
7	Porcentagem de isolamentos obtidos através de diferentes meios confirmativos (NMP/48 horas) para a contaminação fecal -----	52
8	Culturas isoladas dos meios VRBA e DLA que apresentaram resultados positivos em CTABL-43°C/48 horas e em EMB-35°C/24 horas -----	54
9	IMViC das culturas de <i>Escherichia coli</i> isoladas dos meios presuntivos para coliformes totais -----	56
10	IMViC das culturas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de diferentes técnicas para enumeração de coliformes fecais -----	57
11	Número de tubos positivos após 24 horas de incubação de acordo com 4 meios líquidos testados para a enumeração de coliformes fecais --	59

LISTA DE QUADROS

<u>Quadro</u>		<u>Página</u>
1	Técnicas avaliadas para a enumeração e isolamento de coliformes totais -----	30
2	Técnicas avaliadas para a enumeração e isolamento de coliformes fecais -----	31

1. INTRODUÇÃO

Dentre os atributos que definem a qualidade de um alimento, vem crescendo em importância a preocupação com as suas características microbiológicas. Tratando-se de condições de efeito imediato sobre a população, não se pode correr o risco de lançar ao comércio um gênero alimentício sem que não se tenha previamente a certeza, dentro de uma alta probabilidade, de que este não seria responsável por surtos de toxi-infecções.

O controle microbiológico, por natureza, demanda tempo sobretudo ao se considerar as necessidades de períodos de incubação e procedimentos bioquímicos muito variados, de acordo com as famílias e gêneros estudados.

Face a estas e outras necessidades particulares, meios indiretos são utilizados bem como a restrição ao estudo de certos microrganismos ou grupo desses, evitando-se um retardo na linha de produção com implicações mais sérias para a estrutura do mercaço.

Apesar das controvérsias com relação aos microrganismos mais representativos da qualidade sanitária de um produto alimentício, os coliformes em geral, a *Escherichia coli* e os enterococos, têm merecido, conforme SHARF (59), maior consideração. O autor cita que, embora esses microrganismos possam não trazer risco à saúde, podem indicar condições sanitárias, que conduzem à deteriorações e perda da qualidade, com conseqüente perigo à saúde humana. Para THATCHER & CLARK (66), indicam algum grau de perigo potencial, pois assume-se que o habitat natural sejam as fezes do homem e de outros mamíferos.

Para muitos bacteriologistas, comentam NICKERSON & SINSKEY (48), os resultados dos testes para o grupo coliforme em alimentos têm pequeno significado e somente a presença de coliformes fecais, particularmente a *Escherichia coli*, poderia ser usada para avaliar o desempenho sanitário. HALL, BROWN & LEWIS (30) já consideram que o significado exato da presença das bactérias coliformes não está ainda claramente definido.

Tentativas de correlação entre o índice de coliformes com a incidência de patógenos como a *Salmonella* e a atual atenção dispensada a *Escherichia coli* enteropatogênica, conferem maior amplitude ao significado da presença dos coliformes em alimentos.

Uma vez que o grupo coliforme contém espécies individuais cujo habitat seja não intestinal, informam FISHBEIN *et alii* (25) e o que freqüentemente se tem demonstrado, BARDSLEY (6), LEITÃO, ROMEU & CRUZ (35) e THATCHER & CLARK (66), através do isola

mento de diferentes gêneros e espécies a partir de outras fontes, os coliformes fecais e, em especial, a *Escherichia coli* adquirem maior significado para um diagnóstico, destacando-se os biotipos I e II (5, 53, 58, 65).

De acordo com ANDREWS *et alii* (1), a despeito de os coliformes serem ou não inadequados indicadores da segurança microbiológica da água e alimentos, os membros desse grupo continuam sendo usados internacionalmente para esse fim. Observando-se a resolução nº 13/78 da COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS (15), verifica-se a prescrição de limites máximos para os coliformes de origem fecal para a maioria dos alimentos legislados. Por recomendação desta resolução, até que sejam estabelecidas as normas oficiais de amostragem e técnicas de análise microbiológica, o Compendium of Methods for the Examination of Foods da APHA (16) deve ser adotado com esta finalidade.

Vários métodos e meios para a enumeração e identificação de microrganismos são citados e descritos na literatura especializada. A sensibilidade dessas técnicas bem como o significado de seus resultados têm sido objeto de estudos, contribuindo-se desta forma para a orientação na escolha de procedimentos que forneçam dados precisos, confiáveis e expressivos.

Segundo FISHBEIN *et alii* (25), a natureza do meio e as condições de incubação, separadas ou coletivamente, podem afetar os resultados para o grupo coliforme, sendo essencial que os resultados qualitativos ou quantitativos sejam expressos em termos

do teste usado.

Os méritos relativos às técnicas empregadas para coli formes, comentam THATCHER & CLARK (66), tendem a ser conflitantes onde dados resultantes de estudos comparativos ainda não são sufi cientes para estabelecer a extensão em que medem os mesmos micror ganismos ou registram os diversos tipos em proporção comparável.

As técnicas atualmente empregadas para a análise do grupo em alimentos foram, em sua maioria, originalmente utiliza- das para avaliar a qualidade microbiológica da água. FISHBEIN & SURKIEWICZ (23) e RAJ & LISTON (55) afirmam que é insatisfatória a aplicação de idêntica metodologia para alimentos sólidos e ou tros gêneros alimentícios, já que o alimento em si não é inerte, podendo afetar o ambiente físico-bioquímico no qual as reações ocorrem. Acrescentam também os primeiros autores que a flora acompanhante, o processamento e a estocagem do produto podem debi litar o organismo indicador, o que supostamente teria implicações na sua recuperação em laboratório.

Alimentos como carnes, vísceras, produtos marinhos e sobretudo pré-cozidos congelados e alimentos desidratados têm si do utilizados em estudos comparativos sobre a eficiência das dife- rentes técnicas (1, 23, 24, 28, 45, 50, 53, 56, 58, 67, 70), obje tivando a seleção ou mesmo modificação de procedimentos que sejam mais representativos do real estado sanitário. Normalmente buscam -se métodos mais sensíveis e de elevada reprodutividade, que pos sibilitem a recuperação daqueles organismos estressados ou inju

riados por consequência de diferentes fatores causais.

O queijo tipo Minas Frescal é fabricado, na maioria das vezes, com tecnologia rudimentar. Análise de sua qualidade microbiológica feita por GALLO (26) e SILVA, TIBANA & NAYLOR (62) revela a presença de coliformes fecais. Apesar de não ser maturado, traz consigo flora láctica acompanhante que já é reconhecido produzir agentes antimicrobianos (2, 21, 34, 54) que poderiam afetar o desenvolvimento de outras floras e portanto dificultar a enumeração e o isolamento dos coliformes. RAY & SPECK (58) concluíram sobre a provável presença de células de coliformes debilitadas em queijos moles.

Face ao exposto e considerando que não foram encontrados na literatura consultada estudos centralizados no desempenho das técnicas de análise de coliformes nesse produto, justifica-se esse ensaio que teve por objetivos:

Avaliar métodos de enumeração e isolamento de coliformes, visando determinar o significado sanitário dos testes quando aplicados ao queijo tipo Minas Frescal, bem como procurar identificar a metodologia mais específica para a detecção da *Escherichia coli* biotipos I e II.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Grupo Coliforme

Sob a designação de coliformes compreendem-se as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram-negativas, não esporuladas, em forma de bastonetes e que fermentam a lactose com produção de gás em 48 horas, à faixa de temperatura de 32 a 37°C (18, 19, 25, 64).

O grupo engloba os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*, com algumas dúvidas relacionadas a certas espécies por questões taxonômicas: o Manual de BERGEY (8) informa apenas duas espécies para o gênero *Enterobacter*: *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*. EDWARDS & ERWING (20) fornecem para esse gênero, além dessas, as espécies *Enterobacter hafniae* e *Enterobacter liquefaciens*. COLLINS & LYNE (14) citam como coliformes, entre outras, também a *Enterobacter hafniae* e a *Enterobacter agglomerans*, chamando a atenção para a não fermentação ou

fermentação tardia da lactose por parte desses microrganismos e esclarecendo que o último estaria classificado no gênero *Erwinia*. De acordo com EDWARDS & ERWING (20) o nome *Enterobacter agglomerans* tem sido proposto para a bactéria *Herbicola lathyri*. Acrescenta que o gênero deixa de crescer ou o faz pobremente a 37°C e que freqüentemente tem sido referido como coliforme devido à natureza das lesões que causa em tecidos de plantas, bem como por suas reações bioquímicas. O Manual de BERGEY (8) não faz menção a este gênero dentro da família *Enterobacteriaceae*, no entanto informa sobre a espécie *Erwinia herbicola* pertencente ao grupo B do gênero *Erwinia*. Com relação a *Enterobacter hafniae*, o Manual relata apenas o gênero *Hafniae* cuja única espécie refere-se à *Hafniae alvei*, informando que Sakazaki sugere sua possível inclusão no gênero *Enterobacter*. Segundo MACFADDIN (38), *Hafniae alvei* pertence à nova taxonomia, sendo a atual designação da *Enterobacter hafniae*.

COSTA (18) reporta que o grupo coliforme tal como é definido engloba as bactérias: *Escherichia* (*Escherichia coli*), *Citrobacter* (*Citrobacter freundii*), *Arizona* (*Arizona hinshawii*), *Klebsiella* (*Klebsiella pneumoniae*), *Enterobacter* (*Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*) e *Pectobacterium* (*Pectobacterium carotovorum*). Segundo EDWARDS & ERWING (20) a *Arizona* é responsável por diferentes tipos de reações quando em presença da lactose, sendo sua taxa de positividade de 61,3%, no período de 1 a 2 dias, e 16,7%, após 3 ou mais dias.

GALLO (26) reproduz a informação, segundo ele extraída

de Jawetz *et alii* em 1970, de que além da *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, freqüentemente são incluídas no grupo coliformes, a *Salmonella* e a *Shigella*; entretanto, a literatura consultada e explorada não evidencia maiores informações e esclarecimentos que reforcem este ponto de vista.

Os coliformes constituem uma grande parte da flora normal intestinal. No interior dos intestinos, informam COSTA (18) e GALLO (26), não causam doenças, mostrando-se patogênicos somente ao alcançar outros tecidos como o trato urinário, o trato biliar, o peritônio ou as meninges, causando inflamações. PELCZAR, REID & CHAN (51), tecendo algumas considerações sobre a *Escherichia coli*, esclarecem que os isolamentos bacterioclínicos dessa espécie, podem ser convenientemente agrupados em três categorias, onde as amostras chamadas oportunistas só se tornam maléficas ao atingirem tecidos que não o intestino, ao passo que os tipos enteropatogênicos e enterotoxigênicos assim se manifestam mesmo no trato intestinal.

2.2. Coliformes Fecais como Indicadores de Contaminação

Embora todos os coliformes possam ser encontrados nas fezes humanas e de outros animais, nem todos os membros do grupo têm o mesmo significado sanitário. FISHBEIN *et alii* (25) informam sobre a existência de espécies de habitat não intestinal, como o solo, a água e os grãos.

A presença de coliformes em diferentes ambientes com

ou sem contaminação fecal, mencionam LEITÃO *et alii* (35), tendo sido estudada por inúmeros pesquisadores objetivando avaliar seu emprego como indicadores. Citam Geldreich que verificou o índice de 5,6% do tipo IMViC ++-- em solos não trabalhados ao passo que em solos contaminados alcançava 80,6%. Prosseguem, informando que Mishra *et alii* isolaram 1628 linhagens de coliformes a partir de fezes humanas, excrementos de bovinos, água de esgoto e solo, constatando a presença de *Escherichia coli* tipo I em 95,1; 96,0; 86,7 e 54,1% respectivamente e de *Enterobacter aerogenes* nas proporções de 23,1; 10,9; 63,4 e 71,8%. Reportam, ainda, Sillicker e Greenberg que isolaram bactérias coliformes que não a *Escherichia coli* a partir de hortaliças, o que não poderia ser interpretado, *a priori*, como evidência de contaminação fecal.

LEITÃO *et alii* (35), observando a ocorrência dos coliformes no solo, água e vegetais, concluíram que, das 528 culturas isoladas desses ambientes, as águas contaminadas mostraram elevada incidência de *Escherichia coli* tipo I (62,4%); já as águas límpidas de montanhas reduziram esta taxa para 3,4%, com predominância dos tipos IMViC ---+, -++ e intermediários. Verificaram também que os solos virgens de mata apresentaram pequena incidência de *Escherichia coli* tipo I (6,0%), com predominância de *Citrobacter* (40,0%).

Do estudo realizado por BARDSLEY (6) com água, solo, fezes e sorvetes, para verificar a distribuição e o significado dos coliformes, o autor concluiu que os organismos não estão largamente distribuídos na natureza, exceto quando ocorre contaminação fe

cal por um período mais ou menos remoto. Comenta que a ocorrência de aerogenes e tipos intermediários em alimentos e suprimentos de água podem decorrer desse tipo de contaminação, embora a presença desses, na ausência das bactérias coli, sugere apenas que a contaminação não tenha sido recente.

Segundo COSTA (18), a *Escherichia coli* é sempre de origem fecal, morrendo quando habitando a água já que dificilmente encontra, nesta, condições para se multiplicar. BARDSLEY (5) informa que existe uma forte razão para acreditar que a *Escherichia coli* tipo I seja o organismo predominante do intestino, ocorrendo raramente em água, a menos que a poluição excretal tenha sido recente. O mesmo não acontece com outros membros do grupo como a *Enterobacter aerogenes*, esclarece COSTA (18), que tem uma resistência um pouco maior. O autor ainda prossegue mencionando que a taxa de mortalidade da *Escherichia coli* acompanha a taxa de mortalidade das bactérias patogênicas como a *Salmonella typhi*. MONTES (44) já aborda que esse microrganismo é mais resistente às condições ambientais externas do que a *Salmonella* e *Shigella*, daí ser aceito como indicador.

A dicotomia dos coliformes fecais e não fecais, citando COSTA (18), está fundamentada na premissa de que a *Escherichia coli* e variedades afins são de origem fecal direta, e que a *Enterobacter aerogenes* e seus correlatos não o são. BARDSLEY (5) reforça, relatando que organismos do tipo intermediário aerogenes-cloacae, embora também encontrados freqüentemente nos intestinos, acre

dita-se serem numericamente restritos nas fezes, quando comparados à *Escherichia coli* I, habitando também, por outro lado, os solos e grãos.

De acordo com THATCHER & CLARK (66) e GELDREICH *et alii* (27), a *Escherichia coli* é aceita como o mais positivo indicador de uma contaminação fecal, entendendo-se por população fecal aquela que, presumidamente, contenha uma alta proporção dessa espécie ou seus variantes, provavelmente de recente origem fecal.

O fracasso para recuperar *Escherichia coli* dos alimentos, FISHBEIN *et alii* (25), não implica em que matéria fecal ou patógenos estejam ausentes, por não ser esse microrganismo um perfeito indicador. Entretanto, dentre muitos, é o melhor disponível até o momento.

POWELL, MOORE & GOW (53) informam que é comum atribuir-se a expressão falso-positivo para os casos de testes positivos para coliformes fecais onde não se pode isolar a *Escherichia coli*, mencionando também a importância dos biotipos I e II.

Discussões têm sido levantadas a respeito de inclusão de *Klebsiella* como indicador de contaminação fecal. Knittel, citado por NEWTON, HARRISON & SMITH (47), considera a *Klebsiella pneumoniae* nesta categoria. BAGLEY & SEIDLER (3) comentam que, quando a *Escherichia coli* pode ser isolada de uma mesma amostra contaminada também por *Klebsiella*, a contaminação fecal é considerada recente. No entanto, ponderam os autores, esse microrganismo não tem sido isolado rotineiramente de uma larga variedade de diferentes

tipos de habitat natural que não seja através dos testes positivos para coliformes fecais.

Com relação à *Citrobacter freundii*, integrante do grupo coliforme, observa-se que até um certo tempo foi designada como *Escherichia freundii*. Os IMViC $-\text{--}^+$ para o intermediário variedade I e $+\text{--}+$ para a variedade II, são citados no STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (64) para a espécie *Escherichia freundii*. Para os intermediários da *Escherichia coli* tipos I e II são fornecidos, de acordo com THATCHER & CLARK (66), os IMViC $-\text{--}+$ e $+\text{--}+$, com débeis reações positivas ocasionalmente encontradas para o teste Voges-Proskauer. O gênero *Citrobacter* tal qual é atualmente definido, esclarecem EDWARDS & ERWING (20), é composto de culturas previamente classificadas como *Escherichia freundii*. De acordo com MACFADDIN (38), *Citrobacter amalonicus* é uma nova designação para a espécie.

Conforme o Manual de BERGEY (8) o gênero é encontrado em água, alimentos, fezes e urina, parecendo habitar normalmente o intestino e sendo encontrado, freqüentemente, em pessoas sadias. O manual esclarece que a espécie *Citrobacter freundii* apresenta morfologia e forma de colônia semelhante às da *Escherichia coli*, porém, seu crescimento ocorre em alguns meios que inibem o crescimento desta. Por informação de NEWTON *et alii* (47), em adição à *Enterobacter cloacae*, possivelmente o gênero *Citrobacter* parece fazer parte da flora normal associada à vegetação.

Estas e outras informações conduzem à aceitação da *Escherichia coli* como o mais acurado indicador de recente contami

nação fecal. Os tipos IMViC ++-- e -+-- são considerados dentro da espécie como indicadores mais precisos desta condição, uma vez que intermediários têm sido isolados de outras fontes. Por outro lado, esses biotipos, também designados *Escherichia coli* tipo I (típico) e tipo II, tem sido demonstrado constituírem grande parte da população excretal. Mishra *et alii*, citados por LEITÃO *et alii* (36), observaram que 83 e 85% das linhagens isoladas de fezes humanas e de bovinos foram representadas por esses biotipos. Um número razoavelmente grande de outras pesquisas tem conduzido a este ponto de vista.

2.3. Metodologia para Isolamento, Enumeração e Diferenciação

2.3.1. Isolamento e Enumeração - Número Mais Provável (NMP) e Contagem Direta em Placas (CDP)

Dada a subdivisão do grupo coliforme em espécies fecais e não fecais, técnicas particulares são utilizadas para a análise de cada grupo.

VAUGHN, LEVINE & SMITH (70) são de opinião de que se a *Escherichia coli*, por si, é uma boa indicação de possível contaminação humana e animal, é óbvio que o mero número de bactérias coliformes pode não constituir, *strict sensu*, um equitativo e acessível índice da qualidade sanitária dos alimentos. Por outro lado, observa-se que a diferenciação entre as espécies não fecais e fecais se processa, na maioria dos casos, a partir dos testes pre

suntivos de determinação dos coliformes totais, que atuam geralmente na qualidade de enriquecimento seletivo, evitando-se a interferência de outros fermentadores da lactose.

THOMAS, HAROLD & WOODWARD (69), ao estimarem a densidade dos coliformes pela Membrana Filtrante e o Número Mais Provável e verificando deficiências estatisticamente comprovadas por parte deste último, opinam que, ao se tratar do grupo, na sua totalidade, face às limitações inerentes ao seu valor interpretativo, surgem dúvidas quanto ao peso dessas diferenças com relação a outros aspectos relevantes como reprodutibilidade, rapidez, conveniência e custo.

Uma ampla variedade de técnicas está disponível ao analista de laboratório e aos pesquisadores, tratando-se de procedimentos desde os mais simples àqueles de maior nível de sofisticação tecnológica. Para os coliformes, independente de sua categoria, são citados o emprego do Número Mais Provável (NMP), da Contagem Direta em Placas (CDP), da Membrana Filtrante (MF), do Infravermelho, da Imunofluorescência e da Impedância Elétrica.

Verifica-se em trabalhos rotineiros e em estudos sobre as condições higiênico-sanitárias dos alimentos, a predominância da utilização do Número Mais Provável (NMP) e, em segundo lugar, a Contagem Direta em Placas (CDP). A Membrana Filtrante (MF) tem sido reservada a análises de água e, de acordo com STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTERWATER (64), experiências indicam ser mais aplicável a águas salinas. As demais técnicas

cas mostram-se, em geral, de uso mais restrito.

Segundo RAY & SPECK (56), devido ao grande grau de variabilidade observado pelo uso dos meios líquidos, ou seja, do Número Mais Provável (NMP), tem-se recentemente preferido o emprego dos meios seletivos sólidos com inoculação por incorporação. A inoculação em superfície tem sido reportada como responsável por resultados mais satisfatórios.

O Número Mais Provável (NMP) é recomendado pelos órgãos oficiais (25, 42, 64, 66), para a análise do grupo coliforme total e fecal em água e alimentos. COSTA (18) apresenta um resumo da evolução do método desde os estudos de Smith até sua performance atual, descrevendo o raciocínio matemático-estatístico nele utilizado. Informações também são fornecidas no STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTERWATER (64), por COLLINS & LYNE (14) e WOODWARD (72).

BISSONNETTE *et alii* (9) sugerem cautela ao se comparar os valores do Número Mais Provável (NMP) com os resultados obtidos pela Contagem Direta em Placas (CDP) com inoculação por incorporação ou Membrana Filtrante (MF). Esclarecem que, devido ao estabelecimento de tendências no Índice do Número Mais Provável (NMP), a estatística baseada nesses valores nem sempre se torna representativa da densidade absoluta, o que dificulta a interpretação dos resultados em comparação com os de outras técnicas. Complementando, o STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTERWATER (64) condiciona o melhor atributo sobre a qualidade

sanitária à interpretação dos resultados do método Número Mais Provável (NMP), o que é válido também para outros procedimentos. As tabelas construídas para atender ao método fornecem os limites inferiores e superiores, ao nível de 95% de probabilidade, para a verdadeira densidade populacional estimada (18, 64, 66, 72).

A pouca exatidão dos resultados do Número Mais Provável (NMP) é voz corrente dentro da comunidade científica (9, 28, 42, 56, 57), entretanto, algumas limitações, de acordo com MC CARTHY, THOMAS & DELANEY (42), fazem com que a Contagem Direta em Placas (CDP), considerada mais reprodutível e precisa, não seja adotada oficialmente.

FISHBEIN *et alii* (25) registram que poucos métodos têm aplicação prática para a análise de água, esgoto e produtos lácteos, e que o primeiro desses foi o sistema *pour plate* no meio Vermelho Violeta Bile Ágar (VRBA), atribuindo-se à temperatura do meio (45°C) um efeito de estresse sobre muitas células coliformes. O método é proposto, opcionalmente com Desoxicolato Lactose Ágar (DLA) como teste presuntivo para o grupo coliforme no STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS (63).

RAY & SPECK (56), estudando as causas da baixa detecção de *Escherichia coli* nos meios seletivos, concluíram que a manipulação do método de inoculação por incorporação condicionam esses resultados. Atribuem à temperatura do ágar ($45 \pm 1^\circ\text{C}$) o principal fator para subestimar a enumeração das células viáveis tanto no Vermelho Violeta Bile Ágar (VRBA) quanto no Desoxicolato Lactose Ágar (DLA). Demonstraram que o grau de inibição no Desoxicolato

Lactose Ágar (DLA) é maior, dependendo do tipo de inoculação e, finalmente, sugerem a inoculação em superfície como alternativa vantajosa, também observada por RAY & SPECK (57) para o Vermelho Violeta Bile Ágar (VRBA).

O estresse subletal irreversível tem sido foco de muitas pesquisas (9, 10, 22, 28, 32, 40, 41, 46, 49), conduzindo ao consenso de que os agentes seletivos, tais como sais biliares, lauryl sulfato e desoxicolato são inibidores para o reparo e subsequente multiplicação dos coliformes submetidos a injúrias prévias. A este estresse secundário, HACKNEY, RAY & SPECK (28) e HARTMAN, HARTMAN & LANZ (32) têm atribuído ser decorrente do emprego de elevadas temperaturas. O enriquecimento não seletivo tem sido sugerido a fim de que organismos fisiologicamente debilitados possam readquirir a habilidade de se multiplicar e, principalmente, formar colônias nos meios sólidos. Tal procedimento, segundo WARSECK, RAY & SPECK (71), não implicou em efeito adverso da flora acompanhante ao reparo dos coliformes em amostras de alimentos congelados. RAY & SPECK (58) observaram que o método de reparo não tornou o Caldo Bile Verde Brilhante (BVB) menos seletivo durante a confirmação de colônias isoladas do VRBA em produtos lácteos. Informam WARSECK *et alii* (71) que o enriquecimento não seletivo é essencial também ao Número Mais Provável (NMP), não sendo restrito aos meios sólidos. RAY & SPECK (57) relatam que os níveis populacionais em BVB foram maiores quando as células foram primeiramente separadas. Estudos de MAXCY (41) mostraram que tanto o BVB quanto o VRBA e DLA tiveram igual efeito inibitório so

bre *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, cuja sensibilidade entre as culturas também se demonstrou ser equivalente.

Outra limitação que tem sido atribuída ao emprego da Contagem Direta em Placas (CDP) é a de que baixos níveis de densidade microbiana não podem ser detectados. HACKNEY *et alii* (28) reportam que a contagem indireta só é mais acurada que a direta, se a densidade populacional for muito baixa. RAY & SPECK (57) afirmam que a contagem direta em VRBA não só tem sido considerada mais reprodutível como também fornece o isolamento quantitativo de baixos índices de coliformes em alimentos. Por outro lado, CHAMBERS (12) observou que em meios líquidos, diferentes culturas de coliformes variam na densidade de população necessária para a produção de gás visível, tendo descoberto ser em média de 170 milhões por ml de caldo de lactose e 40% a mais para o BVB. Esclarece o autor que o número inicial de bactérias tem relativamente pequeno efeito sobre a quantidade necessária de organismos para a produção de gás, tendo-o, entretanto, marcadamente, sobre o tempo necessário. Informa ainda que, quando a razão não coliformes/coliformes é alta, gás visível pode não ser produzido prontamente mesmo que coliformes estejam presentes em considerável número na amostra original. Em consequência, sugere o uso de meios confirmatórios como o BVB para evitar falso negativos em Caldo de Lactose.

Dentre os meios empregados para o Número Mais Provável (NMP) do grupo coliforme, destacam-se citando THATCHER & CLARK (66), o BVB, o LST e o caldo Mac Conkey, onde os dois primeiros

são seguidos de confirmação adicional em VRBA ou Endo Agar e BVB, respectivamente. Este último não se tem mostrado ser tão utilizado quanto os outros dois. Os méritos desses meios são conflitantes e THATCHER & CLARK (66) comentam que ainda não se sabe em que extensão eles medem os mesmos microrganismos.

RAY & SPECK (57), encontraram que o LST foi menos eficiente para detecção de *Escherichia coli* do que o BVB, o que já não ocorreu quando as células foram submetidas a pré-enriquecimento. Seus resultados mostraram que o índice de detecção aumentou sensivelmente no LST após o período de reabilitação, ao passo que para o BVB, apesar de maiores índices, não foi tão acentuado.

MOUSSA *et alii* (46), comparando cinco meios líquidos para o isolamento de coliformes em produtos desidratados e congelados, comentam que o BVB é recomendado por métodos oficiais e semi-oficiais e, no entanto, em decorrência do ensaio, observaram que não foi tão eficiente. Verifica-se que, de um modo geral, o LST propiciou maiores resultados quantitativos para coliformes, o que não foi tão característico para o grupo fecal. Os autores também mostraram a influência do período de incubação no número de tubos positivos onde o BVB e o LST tiveram como porcentagem de positividade, após 24 horas, as taxas de 53,6 e 57,9%, respectivamente. Das 186 amostras estudadas, encontraram apenas 13 resultados falso positivos para a relação coliformes/enterobacteria, dos quais, entre os cinco meios, três foram provenientes do BVB e um do LST.

Uma vez que se tem demonstrado interesse no emprego

dos meios sólidos, por serem mais acurados e por necessitarem de um menor tempo de incubação, a maior parte dos estudos tem sido conduzida no sentido de comparar os resultados dos métodos Número Mais Provável (NMP) e Contagem Direta em Placas (CDP), não estando centralizados especificamente no meio de cultura utilizado para ambas. Mesmo assim, observa-se que alguns dados são fornecidos, embora um tanto controvertidos, sobre a eficiência do VRBA em relação ao DLA.

Conforme RAY & SPECK (57), alguns pesquisadores reportam menos que 25% de recuperação dos coliformes em VRBA, ao passo que outros observaram boa recuperação, tanto neste quanto em DLA, sendo os dois igualmente satisfatórios. Do experimento que conduziram com amostras congeladas e não congeladas, constataram que enumeração relativamente maior e mais reprodutível para a *Escherichia coli* foi verificada em VRBA do que em DLA. RAY & SPECK (58) observaram variabilidade considerável entre a resistência de diversas cepas de *Escherichia coli* em VRBA e DLA, sendo que a recuperação em DLA mostrou-se sempre menor. HARTMAN (31), analisando potes de tortas de carne, verificou que os dois meios forneceram contagens aproximadamente equivalentes para a flora de coliformes.

Das observações entre a eficiência dos dois métodos básicos para coliformes, tem sido constatado que o Número Mais Provável (NMP) difere marcadamente das demais técnicas fornecendo, com freqüência, resultados mais elevados do que a Contagem Direta em Placas (CDP), mesmo quando se utiliza o enriquecimento não seletivo prévio (9, 28, 42, 56). HACKNEY *et alii* (28) citam Vargas

et alii que mostraram ser alguns dos métodos de contagem em placas, subestimadores da população de coliformes fecais em moluscos, numa taxa de 20%. HACKNEY *et alii* (28) sugerem como explicação para essa subestimação a presença de células injuriadas e sua inability de formar colônias nos meios sólidos seletivos. Para MAXCY (41) o problema em avaliar amostras com baixo número de coliformes pode ser confundido pela presença de células expostas a vários graus de estresse.

2.3.2. Diferenciação entre Coliformes Fecais e Não Fecais

Através dos testes para coliformes fecais, espera-se diferenciar os organismos derivados do intestino dos animais de sangue quente daqueles originados de outras fontes, FISHBEIN *et alii* (25), APHA (64) e THATCHER & CLARK (66). VAUGHN *et alii* (70) e MACKENZIE, TAYLOR & GILBERT (39) citam a expressão diferenciação entre coliformes de animais de sangue quente e de animais de sangue frio.

De acordo com FISHBEIN *et alii* (25) e STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTERWATER (64), elevadas temperaturas com várias modificações têm sido usadas, em muitas partes do mundo, com esta finalidade. DOCKINS & MCFETERS (19) informam que dentre os diferentes procedimentos disponíveis à diferenciação, cabem àqueles que envolvem a incubação dos coliformes a elevadas temperaturas, os maiores sucessos e aceitação.

[REDACTED]

COSTA (18) relata os primeiros estudos nesse sentido, bem como registra, resumidamente, outros processos com temperaturas e meios subseqüentes que deles decorreram. A evolução também é citada por outros autores (22, 24, 27, 70) que também realizaram estudos e propuseram algumas modificações. Coube a Hajna & Perry, Manual BBL (7), a formulação do caldo EC de uso tão difundido e recomendado pelos órgãos oficiais.

Uma definição para os coliformes fecais é fornecida por CHORDASH & INSALATA (13), entendendo-se pelo grupo aqueles membros de família *Enterobacteriaceae* que fermentam a lactose com produção de gás dentro de 24-48 horas e elevadas temperaturas de incubação como 42; 44; 44,5 ou 45,5°C.

FISHBEIN (22) comenta que foi sugerido que todos os tipos de coliformes capazes de produzir gás a 44,5°C sejam de origem fecal. Parr, por ele citado, contesta referindo-se à necessidade de pesquisas nesse sentido, ao que concorda, reforçando a necessidade de se estabelecer os tipos de coliformes que são de verdadeira origem fecal.

DOCKINS & MCFETERS (19), estudando as bases fisiológicas dos testes, concluíram que o efeito inibidor do crescimento e metabolismo das espécies não fecais envolvem componentes celulares comuns ao metabolismo aeróbio e fermentativo da lactose. Observaram que a função da membrana é o principal foco da sensibilidade à temperatura de 44,5°C. FISHBEIN (22) concorda, mencionando a inibição do sistema enzimático de produção de gás como agente de causa.

Considerando a *Escherichia coli*, principalmente o biotipo I, o indicador mais efetivo, pesquisas foram e continuam sendo desenvolvidas, no sentido da otimização da temperatura de diferenciação, associada a substâncias químicas seletivas.

Temperaturas de 45,5 a 46°C, consideradas críticas para outras espécies, são reportadas como inibitórias para algumas cepas de *Escherichia coli*, VAUGHN *et alii* (70), COSTA (18) e HAJNA & PERRY (29). Verificando o tempo de geração da *Escherichia coli* a diferentes temperaturas, BARBER (4) constatou que sua reprodução inicia-se a 10°C, aumentando rapidamente a 37°C, onde atinge a maior velocidade de crescimento, com um tempo de geração de 17 minutos. Esse comportamento se manteve constante até 45°C, onde a taxa de multiplicação diminui rapidamente, cessando-se a reprodução a 49°C. Esses resultados não podem, segundo FISHBEIN (22), serem extrapolados, uma vez que os estudos foram conduzidos com uma única variedade.

SHERWOOD & CLEGG (60) informam que temperaturas acima de 44°C em caldo Mac Conkey, reduziram significativamente o número de *Escherichia coli*; entretanto, temperaturas menores permitem a produção de gás por outros tipos de coliformes. TAYLOR (67) observou que muitas cepas dessa espécie produziram gás, nesse caldo, na faixa de temperatura de 40 a 44°C e que o número não foi apreciavelmente reduzido a 45°C mas sim, marcadamente menor a 46°C. BARDSLEY (5) afirma que a estimativa numérica da *Escherichia coli* tipo I pode ser inacurada, nesse meio a 44°C, se irregulares tipos I e II estão presentes, onde o primeiro subestima e o segundo

superestima a taxa. SHERWOOD & CLEGG (60) verificaram que poucas cepas do biotipo I deixaram de crescer e produzir gás a 44°C, sendo numericamente balanceadas pela presença dos tipos irregulares II e VI, que foram positivos.

MACKENZIE *et alii* (39), fundamentados em que fermentadores da lactose anaeróbios como o *Clostridium perfringens* podiam crescer e produzir gás no caldo Mac Conkey a 44°C, realizaram um ensaio do qual sugeriram o uso do Bile Verde Brilhante no lugar deste. O meio suprime o crescimento do *Clostridium* e não influencia negativamente a *Escherichia coli* típica. Considerando que irregulares II e VI fermentam a lactose a esta temperatura, os pesquisadores sugeriram paralelamente a prova do Indol para as suspensões crescidas a 44°C. Neste caso o procedimento se tornou mais específico para a *Escherichia coli*, excluindo-se outros organismos ora pelo BVB, ora pelo Indol, ambos a 44°C, precedidos do enriquecimento em Caldo Mac Conkey a 37°C.

FISHBEIN *et alii* (24), analisando alimentos congelados, apesar de observarem que a temperatura de 45,5°C proporcionou menores incidências de falso positivos, mostram que os resultados quantitativos desse procedimento, foram menores que os outros testados. FISHBEIN & SURKIEWICZ (23), também com congelados, ao compararem o caldo EC a 44,5°C e a 45,5°C, verificaram que, em 85,3% dos casos, os resultados foram semelhantes para *Escherichia coli* positiva, falso positivos e negativa; no entanto, mostram que o índice de coliformes fecais foi ligeiramente maior em 44,5°C. Citam também que os índices para *Escherichia coli* aumentaram após

24 horas de incubação, aumentando também o número de falso positivos, o que implicou na diminuição da especificidade. Os autores recomendam para esses produtos a temperatura de 45,5°C por 24 horas de incubação.

Avaliando a eficiência do caldo EC com os caldos Lauryl Sulfato e de Lactose, todos a 37 e 45,5°C, PERRY & HAJNA (52) concluíram que os dois primeiros são meios altamente sensíveis e específicos para o isolamento de coliformes da água, produtos marinhos e esgotos, sendo o caldo EC um tanto mais específico, tendo propiciado excelentes resultados tanto para o grupo, a 37°C quanto para a *Escherichia coli* a 45,5°C em leite. Os autores informam que poucos resultados falso positivos foram encontrados por cinco laboratórios para o caldo EC. Chamam também a atenção para a expressão falso presuntivo, devido à existência de fracos fermentadores da lactose, que podem ser esperados tanto para o EC como para o Lauryl Sulfato.

FISHBEIN (22) constatou que grande atividade de gás ocorre no caldo EC e que 92% das culturas de *Escherichia coli* produziram gás na faixa de 44,9 a 45,5°C enquanto que o gênero *Enterobacter* revelou as proporções de 68 a 2%, respectivamente, nessa habilidade. Atribui à temperatura de 45,5°C o ponto natural de separação. Verificou que o grupo atípico -+-- foi mais resistente que o típico ++--, fato também encontrado por Stuart *et alii*, por ele referenciado. LEITÃO *et alii* (36), entretanto, observaram que 97,3% das cepas de *Escherichia coli* típica exibiram atividade de gás em EC a 45,5°C, onde os tipos -++ e --++ fizeram-no nas

proporções de 6,8 e 8,2% e que dos tubos positivos, 92,8% pertenceram ao biotipo ++-- e 6,6% ao -+--.

A especificidade do caldo EC a 44,5°C tem sido reportada como duvidosa. De acordo com FISHBEIN (22), essa temperatura tem permitido que várias quantidades de coliformes outros que não a *Escherichia coli*, produzam gás. POWELL *et alii* (53) comentam que essa especificidade não foi muito alta para alimentos congelados, carne cozida de caranguejos e filés refrigerados. RAJ & LISTON (55) também obtiveram resultados semelhantes com produtos marinhos congelados, e citam esta inespecificidade particularmente quando culturas de *Escherichia coli* constituem a minoria na flora total de coliformes. POWELL *et alii* (53) isolaram *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Serratia* do caldo EC e, ao retestá-los em culturas puras, observaram que foram hábeis para crescer a 44,5°C. Somente em 40,4% dos tubos positivos de EC a 44,5 ± 0,1°C foi constatado, por HALL *et alii* (30) conter *Escherichia coli*, quando diferentes alimentos comercializados, entre eles o queijo, foram analisados. Mishra *et alii*, citados por LEITÃO *et alii* (36), constataram que 52% de culturas do tipo IMViC --++ isoladas de fezes humanas foram positivas no teste EC a 44,5°C. Espécies do gênero *Entero*-*bacter* numa razão de 70,0%, produziram, conforme FISHBEIN (22), gás a esta temperatura, onde, de 18 culturas da espécie *Enterobacter cloacae*, 17 não mostraram essa habilidade. O autor informa também que a 45,3°C *Citrobacter* é isolado com freqüência.

HAJNA & PERRY (29) conduziram um ensaio para determinar temperaturas de incubação menores que 46°C que pudessem ser

usadas seletivamente para a *Escherichia coli* e verificaram que muitas cepas de *Aerobacter aerogenes* produziram gás de lactose a 42 e 44°C e poucas a 46°C, tendo ocorrido o mesmo para a *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter*, onde essas últimas não produziram a 46°C. Dentre os seus resultados concluíram que, em temperaturas entre 45 e 46°C, outros tipos que não *Escherichia coli* deixam de crescer e, portanto, produzir gás do carboidrato. Observaram que das 1374 culturas de *Escherichia coli* estudadas, apenas cinco, apesar de crescerem abundantemente, não exibiram atividade de gás a 46°C. Os autores mencionam dados de outros ensaios que sugerem temperaturas maiores que 45,5°C, temperaturas essas do meio de cultura e não de incubador, sendo essenciais para a supressão de outros tipos de coliformes.

De acordo com Minkevich, Alexandrov e Sobelova, citados por HAJNA & PERRY (29), em muitos casos, elevadas temperaturas, como 46°C, reprimem o crescimento de pequenos números de *Escherichia coli* e, como consequência, propõe, o emprego de temperaturas de 43,5°C no meio Buhir. O enriquecimento em caldo de Lauryl Sulfato também foi sugerido, no decorrer da evolução das técnicas, como alternativa para os casos de baixas densidades populacionais fecais.

A esta faixa de temperatura é citado, conforme STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTERWATER (64), SHARF (59) e VAUGHN *et alii* (70), o meio de ácido bórico lactose combinando a ação inibitória do ácido bórico, à temperatura de \pm 43°C. Levine e outros, informam VAUGHN *et alii* (70), mostraram o efeito

inibidor desse agente químico sobre cepas de *Enterobacter aerogenes*. Uma modificação na constituição do meio, em 1934, com a incubação de 42,5 a 43,5°C, mostrou positividade em 48 horas para todas as culturas de *Escherichia coli* testadas, tendo suprido o crescimento de *Aerobacter*, com poucas exceções para *Enterobacter freundi* e *Enterobacter intermedium*. A evolução do método é exposta ainda por VAUGHN *et alii* (70), que se reporta também às opiniões controvertidas sobre a sua eficiência. Segundo STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (64), o caldo de ácido bórico lactose possui a mesma seletividade e sensibilidade de que o caldo EC, variando-se apenas a temperatura de incubação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização Geral do Ensaio e Técnicas Testadas

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, no período de março a junho de 1981.

Dez unidades de queijo tipo Minas Frescal preparadas com tecnologia desconhecida, supostamente rudimentar, e vendidas sem embalagem, foram adquiridas de um único fornecedor da feira da cidade de Lavras-MG e analisadas por diferentes técnicas para coliformes totais e fecais, conforme discriminadas nos Quadros 1 e 2.

Para as técnicas nºs 1 a 7 da Tabela 2, foram utilizados os repiques de tubos presuntivos positivos e para as de nºs 8 a 11, foram tomadas, ao acaso, 10 colônias típicas.

Quadro 1 - Técnicas avaliadas para a enumeração e isolamento de coliformes totais

Nº da Técnica	Meio Presuntivo	Incubação		Meio Confirmativo	Incubação		Fonte
		Temperatura (°C)	Tempo (h)		Temperatura (°C)	Tempo (h)	
1	LST	35 [±] 1	24-48	BVB e EMB	35 [±] 1	24-48	25, 48, 64 e 66
2	BVB	35-37	24-48	VRBA	35-37	24	63 e 66
3	MC	37 [±] 1	24-48	-	-	-	66
4	VRBA	35	18-24	LST e BVB	35	24	25, 48, 59 e 63
5	DLA	35	18-24	LST e BVB	35	24	59 e 63

Método do Número Mais Provável : técnicas nºs 1, 2 e 3

Método da Contagem Direta em Placas: técnicas nºs 4 e 5

LST = Lauryl Sulfato Triptose; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; MC = Mac Conkey; VRBA = Vermelho Violeta Bile Ágar; DLA = Desoxicolato Lactose Ágar.

Quadro 2 - Técnicas avaliadas para a enumeração e isolamento de coliformes fecais

Nº da Técnica	Incubação		Meio Presuntivo	Incubação		Meio Confirmativo	Incubação		Fonte
	Temperatura (°C)	Tempo (h)		Temperatura (°C)	Tempo (h)		Temperatura (°C)	Tempo (h)	
1	35 ^{±1}	48	LST	45,5 ^{±0,2}	24-48	EC	48 e 66		
2	35 ^{±1}	48	LST	44,5 ^{±0,2}	24-48	EC	25 e 64		
3	37 ^{±1}	48	MC	44	24-48/24	BVB/AP	66		
4	35 ^{±1}	48	LST	35	18-24	EMB	59		
5	35-37	48	BVB	35	18-24	EMB	59		
6	35 ^{±1}	48	LST	43 ^{±0,5}	24-48	CTABL	59 e 64		
7	35-37	48	BVB	43 ^{±0,5}	24-48	CTABL	59		
8	35	24	VRBA	35	18-24	EMB	59		
9	35	24	VRBA	43 ^{±0,5}	24-48	CTABL	59		
10	35	24	DLA	35	18-24	EMB	59		
11	35	24	DLA	43 ^{±0,5}	24-48	CTABL	59		

LST = Lauryl Sulfato Triptose; MC = Mac Conkey; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; VRBA = Vermelho Violeta Bile Ágar; DLA = Desoxicolato Lactose Ágar; EC = Caldo EC; AP = Água Peptonada; EMB = Eosina Azul de Metileno; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose.

Para os meios líquidos, considerou-se positivos aqueles tubos que apresentaram crescimento com produção de gás. Para os meios sólidos, como o Vermelho Violeta Bile e o Desoxicolato Lactose, registrou-se as colônias de coloração vermelho-escuro, rodeada por zona de precipitado de bile, com pelo menos 0,5 mm de diâmetro, de acordo com SHARF (59), FISHBEIN *et alii* (25) e THATCHER & CLARK (66). Para o meio Eosina Azul de Metileno, quando usado como confirmativo para coliformes totais, observou-se as colônias escuras ou de centro escuro com periferia transparente, nucleadas, com ou sem brilho metálico, conforme THATCHER & CLARK (66) e, quando usado para a determinação de contaminação fecal, colônias ligeiramente elevadas, com 2-3 mm de diâmetro, topo plano ou côncavo, centros escuros e um brilho metálico esverdeado, por recomendação de SHARF (59).

A confirmação para o grupo coliformes totais, nas técnicas nºs 4 e 5, implicou também a coloração de gram, por exigência da própria técnica.

Para a determinação dos coliformes fecais, o controle da temperatura foi efetuado através de banho-maria termostaticamente controlado.

3.2. Cômputo da Densidade Populacional

O Número Mais Provável foi estimado pela série de três tubos, conforme THATCHER & CLARK (66) e, para a Contagem Direta em Placas, foram feitas inoculações em duplicata, selecionando-se,

para o registro da média, aquelas diluições com 30 a 300 colônias, de acordo com as recomendações dos mesmos autores.

3.3. Preparo da Amostra

Segundo THATCHER & CLARK (66), homogeneizou-se 50 gramas do produto, em desintegrador, com 450 ml de diluente de pepto_na a 0,1%. A partir desta suspensão inicial, foram preparadas as diluições decimais.

3.4. Esquema de Isolamento e Provas Bioquímicas

A partir de dois tubos positivos para coliformes totais e dois para fecais, de maior concentração de inóculo, procedeu-se a plaqueamentos, por incorporação em ágar padrão, a 37°C, por 48 ± 2 horas para o primeiro caso, e por estrias, em EMB ágar, a 37°C, por 24 ± 2 horas para o segundo. Posteriormente, dez colônias foram selecionadas ao acaso, de cada técnica em estudo e repicadas em tubos inclinados de ágar padrão (18-24 horas/37°C), para ter início o processo de provas bioquímicas. Quando a técnica empregada consistia da utilização de meios sólidos, caso do Vermelho Violeta Bile Ágar (VRBA) e Desoxicolato Lactose Ágar (DLA), as dez colônias selecionadas diretamente dos meios presuntivos foram transferidas para os tubos inclinados de ágar padrão, onde somente após comprovação de sua pureza procedia-se aos testes bioquímicos e aos testes para coliformes fecais.

Foi empregado o método clássico de identificação, ini-

ciando-se pelos testes citocromo-oxidase e coloração de Gram. Como meio de triagem para Enterobactérias utilizou-se o "Triple Sugar Iron Agar" (TSI) e o "Lisin Iron Agar" (LIA), seguindo-se provas bioquímicas tais como: Indol, vermelho de metila, Vogues-Proskauer, citrato, ornitina descarboxilase, arginina dihidrolase, lisina descarboxilase, triptofano desaminase, o-nitrofenil- β -D-galactosídeo (ONPG), lactose, manitol, melobiose, inositol, sorbitol, uréia, malonato, motilidade e em alguns casos rafinose e cianeto de potássio (11, 38, 43, 66).

Em caso de dúvida para a pureza das culturas, repicagens sucessivas foram feitas em Eosina Azul de Metileno Ágar (EMB). Nos casos de incerteza quanto à identidade do organismo, empregou-se o Enterotube, com 11 testes, bem como sete cepas foram encaminhadas ao Instituto Oswaldo Cruz-RJ, para comprovação de diagnóstico.

3.5. Tratamento Estatístico

Os resultados quantitativos foram analisados estatisticamente, através do modelo do delineamento blocos casualizados, sendo cada queijo considerado uma repetição. Foram utilizados os testes de Tukey e de Scheffé para a comparação dos resultados médios, referentes às 5 técnicas, para coliformes totais, e às 11, para fecais. Os dados foram previamente submetidos a transformação logarítmica, onde no caso dos coliformes fecais efetuou-se a transformação logarítmica de $x + 2,5$.

Para a avaliação da seletividade dos diferentes procedimentos analíticos, não se aplicou método estatístico, onde os resultados foram explorados sobre os percentuais de cepas isoladas.

A frequência de ocorrência para determinados casos também foi utilizada, tanto para as discussões quantitativas como qualitativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coliformes Totais

A despeito da significância (Tabelas 1 e 1-A do Apêndice) detectada entre as técnicas nº 2 e nº 4, observando-se, sobretudo, as potências na base 10, verificou-se que os resultados foram equivalentes, tanto para o Número Mais Provável (NMP) quanto para a Contagem Direta em Placas (CDP) com inoculação por incorporação.

Não obstante, verificou-se uma tendência para contagens mais baixas, quando os meios sólidos foram empregados, em acordo com a literatura (9, 28, 42, 56), entretanto, surgem dúvidas quanto ao seu significado, considerando-se a maneira como esses valores diferem entre si, ou seja, valor numérico que antecede ao expoente. KERELUK & GUNDERSON (33), apesar de encontrarem índices de recuperação do grupo ligeiramente mais elevados para o NMP, afirmam que o procedimento não demonstrou resultados suficientemente maio

Tabela 1 - Valores médios da enumeração de coliformes totais após incubação de 48 horas em três meios líquidos (NMP) e 24 horas em dois meios sólidos (CDP)

Nº da Técnica	Meio Presuntivo	Média (colif./g)
1	LST	4,3 x 10 ⁶ ab
2	BVB	6,4 x 10 ⁶ a
3	MC	4,1 x 10 ⁶ ab
4	VRBA	2,8 x 10 ⁶ b
5	DLA	3,0 x 10 ⁶ ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

LST = Lauryl Sulfato Triptose; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; MC = Mac Conkey; VRBA= Vermelho Violeta Bile Ágar; DLA = Desoxicolato Lactose Ágar.

res que a CDP, quando aplicados a tortas congeladas de carnes.

Com relação aos meios confirmatórios, à exceção de duas culturas de *Enterobacter agglomerans* isoladas do VRBA, não ocorreram divergências entre as fases presuntiva e confirmativa para qualquer meio utilizado. Para esta espécie observou-se apenas crescimento em LST e BVB, sem a produção de gás, mesmo após 48 horas de incubação, apesar de serem recomendadas, pela técnica, 24 horas. A inabilidade da espécie em ser confirmada em BVB a 35°C também foi encontrada por RAY & SPECK (58) quando avaliando produtos lácteos. Tal resultado entra em acordo com COLLINS & LYNE (14) quanto à não fermentação ou fermentação tardia da lactose e em desacordo com EDWARDS & ERWING (20) que informam o não ou pobre crescimento do gênero *Pectobacterium* a 37°C.

Diferenças entre os resultados, no caso dos meios líquidos, para os períodos de incubação de 24 a 48 horas foram observadas, conforme ilustradas na Tabela 2.

Verificou-se a superioridade do caldo Mac Conkey, ao propiciar resultados praticamente definitivos, ao término de 24 horas de incubação, após esse período, em 10 amostras de queijo analisadas (90% dos casos). Uma vez que o número inicial de coliformes da amostra exerce um efeito no tempo de incubação necessário à produção de gás visível, segundo CHAMBERS (12), e que, pelos resultados obtidos, as amostras de queijo tipo Minas Frescal continham, em média, 10⁶ coliformes/grama, não se poderia extrapolar os resultados para aqueles produtos com índices menores que esse. A mais

Tabela 2 - Número de tubos positivos após 24 e 48 horas de incubação, de acordo com três meios líquidos (NMP) testados para a enumeração de coliformes totais

Número da Técnica	Meio Presuntivo	Incubação (h)		% de positividade após 24 horas*
		24	48	
1	LST	179	187	4,3
2	BVB	156	190	17,9
3	MC	183	186	1,6

* Calculada sobre o total de tubos positivos após 48 horas de incubação.

LST = Lauryl Sulfato Triptose; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; MC = Mac Conkey.

elevada porcentagem para o caldo BVB, equivalente a resultados de definitivos em 24 horas para 50% dos casos, sugere a necessidade do período completo de incubação para esse meio, menos evidenciada para o caldo LST (70% das amostras). O percentual de positividade de após 24 horas de incubação para o BVB e o LST foi marcadamente menor do que os encontrados por MOUSSA *et alii* (46) para produtos desidratados, o que, provavelmente, se explica pela quantidade de coliformes na amostra e/ou, também conforme CHAMBERS (12), pela razão não coliformes/coliformes para o produto.

Não foram encontrados presuntivos falso positivos tanto para o LST como para o BVB; neste caso supõe-se que o mesmo princípio citado por FISHBEIN *et alii* (25), para produtos marinhos, possa ser aplicado ao alimento em estudo, não sendo necessário confirmar todos os tubos presuntivos positivos de LST. Apesar dos resultados satisfatórios entre os testes presuntivos e confirmativos, a segunda etapa se faz necessária, por se tratar de um alimento que contém carboidratos fermentáveis, citando SHARF (59).

Todos os cinco meios avaliados apresentaram características semelhantes de especificidade para o grupo coliforme, exceto variações em gêneros e/ou espécies conforme exposto na Tabela 3.

Recuperação marcadamente visível foi constatada para a espécie *Enterobacter cloacae* (58,0% dos isolamentos) que, quando distribuída pelos diferentes meios de cultura, apresentou-se equi

Tabela 3 - Culturas isoladas dos diferentes meios líquidos (NMP/48 horas) e sólidos (CDP/24 horas) utilizados no teste presuntivo para o grupo coliformes totais

Microrganismo	Nº de isolamentos	Meios (%*)					% s/o total de isolamento (500 cult.)
		LST	BVB	MC	VRBA	DLA	
<i>Citrobacter freundii</i>	55	27,3	18,2	34,5	7,3	12,7	11
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13	15,4	23,1	38,5	7,7	15,4	2,6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	02	-	-	-	100	-	0,4
<i>Enterobacter cloacae</i>	290	15,2	21,4	20,7	21,0	21,7	58,0
<i>Enterobacter hafniae</i>	08	100	-	-	-	-	1,6
<i>Escherichia coli</i>	77	15,6	19,5	9,1	32,5	23,4	15,40
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	53	35,8	18,9	17,0	11,3	17,0	10,6
<i>Pseudomonas sp.</i>	1	-	-	-	100	-	0,2
Não identificado	1	-	-	-	-	100	0,2

* % sobre o número de isolamentos para o gênero e/ou espécie

LST = Lauryl Sulfato Triptose; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; MC = Mac Conkey; VRBA = Vermelho Violeta Bile Ágar; DLA = Desoxicolato Lactose Ágar.

valente para quase todos, excetuando o LST, que revelou uma tendência menor. Este meio, por outro lado, evidenciou uma ligeira superioridade para a recuperação de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter hafniae*, sendo essa última duvidosa, quanto a sua integração ao grupo coliforme, segundo a literatura. Verificou-se também que o caldo Mac Conkey contribuiu com o menor percentual de isolamentos para a *Escherichia coli* e maiores para a *Citrobacter freundii* e *Enterobacter aerogenes*.

Diferentes pesquisas demonstram o bom crescimento e produção de gás da *Escherichia coli* no caldo Mac Conkey a 44°C, no entanto, em tais estudos foram utilizadas as culturas puras, mencionando-se pouco sobre o seu desenvolvimento, quando outros coliformes estão presentes. BARDSLEY (5) tece alguns esclarecimentos e dentre eles o de que a *Escherichia coli* I tem uma forte tendência para superar o crescimento de intermediários-aerogenes-cloacae e que se estes e a *Escherichia coli* I, estão presentes em números aproximadamente iguais, não é raro que a espécie ganhe ascendência sobre as demais durante o crescimento em caldo Mac Conkey. Dentre as sete cepas de *Escherichia coli* isoladas desse caldo, apenas uma não foi classificada como biotipo I; nesse caso, parece razoável supor que, quando a espécie não constitui a maior parte da flora de coliformes (15,4% dos isolamentos), não existe a tendência de ascensão no caldo Mac Conkey a 37°C.

Constatou-se uma elevada porcentagem de recuperação da *Escherichia coli* nos meios sólidos, principalmente para o VRBA, sugerindo que não tenha ocorrido um efeito de estresse secundário

para a espécie. Por outro lado, poder-se-ia supor ausência ou pequena incidência de injúrias prévias, conforme admitem HACKNEY *et alii* (28), como provável justificativa para uma subestimativa de coliformes fecais. Entretanto, esse fato só poderia ser comprovado através de estudos comparativos de resultados de amostras submetidas a enriquecimento não seletivo e de amostras sem enriquecimento. RAY & SPECK (58), obtendo maiores índices de coliformes pelo uso do processo de reparo, concluíram que, nos queijos moles, provavelmente, estão presentes células de coliformes submetidas a injúrias.

Em acordo com os estudos de RAY & SPECK (56,57), o VRBA apresentou enumeração de *Escherichia coli* relativamente maior que o DLA. HALL *et alii* (30) obtiveram maior porcentagem de isolamentos de *Escherichia coli* em LST do que em VRBA, o que, conforme demonstrado na Tabela 3, não ocorreu neste ensaio. KERELUK & GUNDERSON (33) reportam a maior facilidade para o discernimento entre as colônias de coliformes no VRBA do que no DLA; entretanto, o mesmo não poderia ser considerado no presente estudo. De um modo geral, o DLA propiciou melhores características, quer quanto ao aspecto das colônias bem como menores tendências para alastramento dessas.

Das dez amostras utilizadas no estudo, em duas não foram isoladas culturas de *Escherichia coli* por nenhuma das técnicas presuntivas para coliformes totais, ressaltando-se a superioridade do VRBA seguido do DLA para a recuperação mais constante da espécie, com relação aos meios líquidos. Grande grau de varia

bilidade na detecção de *Escherichia coli* (congeladas e não congeladas) foi verificado por RAY & SPECK (57) para o método NMP, o que se pode considerar ter ocorrido também neste experimento. Por outro lado, RAY & SPECK (56) reportam esta mesma característica para o VRBA, em desacordo com as presentes constatações. A Tabela 4 ilustra melhor essas frequências.

Tudo indica que a competição a favor de outras espécies tenha sido mais marcante nos meios líquidos. COPE, DEMPSTER & CHAPIN (17) informam que o fenômeno de perda ou fracasso para detectar *Escherichia coli* em caldo lactosado é atribuído ao supercrescimento e propriedades antibióticas de algumas cepas de coliformes, especialmente do grupo intermediário, contra a *Escherichia coli*.

A Tabela 5 ilustra a frequência do isolamento dos demais microrganismos recuperados pelos diferentes meios de cultura.

Por uma segunda vez, pela Tabela 5, observou-se a tendência de maior reprodutividade de resultados para os meios sólidos, em particular os dados de frequência para a espécie *Enterobacter cloacae*.

Analisando-se conjuntamente as Tabelas 3 e 5, verificou-se que, caracterizando a microflora do queijo tipo Minas Frescal em termos de coliformes, surge, em terceiro lugar, a *Klebsiella pneumoniae*, já que a frequência da incidência da *Citrobacter freundii*, através dos isolamentos efetuados, foi 50% menor do que a dessa espécie. KERELUK & GUNDERSON (33), examinando os resulta

Tabela 4 - Freqüência do isolamento de *Escherichia coli* por diferentes meios líquidos (NMP/48 horas) e sólidos (CDP / 24 horas) para a enumeração do grupo coliformes totais nas dez amostras de queijo analisadas

Número da Técnica	Meio Presuntivo	Número de Amostras	%
1	LST	3	30
2	BVB	5	50
3	MC	4	40
4	VRBA	8	80
5	DLA	7	70

LST = Lauryl Sulfato Triptose; BV = Bile Verde Brilhante Lactose; MC = Mac Conkey; VRBA = Vermelho Violeta Bile; DLA = Desoxicolato Lactose Ágar.

Tabela 5 - Frequência do isolamento de microrganismos recuperados de 3 meios líquidos (NMP/48 horas) e 2 sólidos (CDP/24 horas) para a enumeração do grupo coliformes totais

Microrganismos	Meios de Cultura (nº de amostras)*				
	LST	BVB	MC	VRBA	DLA
<i>Citrobacter freundii</i>	3	1	3	2	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	2	1	1
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0	0	0	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	8	9	10
<i>Enterobacter hafniae</i>	1	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> **	3	2	3	3	3
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	0	1	0
Não identificado	0	0	0	0	1

* Também correspondente ao percentual quando multiplicado por 10

** Para esta espécie, o nº máximo de amostras não corresponde ao nº de vezes que a cultura esteve presente entre as dez amostras, tendo sido a frequência total de 6 (60%).

LST = Lauryl Sulfato Triptose; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; MC = Mac Conkey; VRBA = Vermelho Violeta Bile Ágar; DLA = Desoxicolato Lactose Ágar.

dos encontrados para o isolamento de coliformes totais em tortas congeladas de carne, concluíram uma indicação de predominante fonte de contaminação não fecal para o produto. A exemplo dos autores, apesar da presença de *Escherichia coli* em 80% das amostras analisadas para coliformes totais e 100% para coliformes fecais, a elevada incidência de recuperação de *Enterobacter cloacae* verificada, poderia conduzir a uma interpretação semelhante, já que a literatura também conduz claramente a isto. GELDREICH *et alii* (27), estudando as reações do grupo coliforme em caldo EC a 45°C, apresenta uma tabela nitidamente diferenciada pelas fontes de contaminação, citando-se como origem fecal, segundo o Standard Methods for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wastes (10.^a edição), apenas os IMViC ++-- e -+-- pertencentes à *Escherichia coli* típica e tipo II, respectivamente.

A presença de *Pseudomonas* sp., apesar de irrelevante mediante os demais resultados encontrados, não foi inesperada uma vez que o VRBA, de acordo com o Manual BBL (7), verificou Collins ser satisfatório para a enumeração do gênero em queijos, quando incubado a 25°C por 48 horas.

4.2. Coliformes Fecais

O resumo da análise de variância acusando diferenças entre os resultados de enumeração para o grupo coliformes fecais encontra-se na Tabela 2A do Apêndice. A Tabela 6, apresenta as médias encontradas.

Tabela 6 - Valores médios de contaminação fecal obtidos através de diferentes técnicas de enumeração do grupo coliformes fecais

Número da* Técnica	Meios e Temperaturas (°C)	Média (Cont.fecal/g)
2	LST ⁺ 35 - EC 44,5	1,1 x 10 ⁶ a
5	BVB ⁺ 37 - EMB 35	1,6 x 10 ⁴ ab
7	BVB ⁺ 37 - CTABL 43	1,2 x 10 ⁴ ab
6	LST ⁺ 35 - CTABL 43	1,1 x 10 ⁴ ab
3	BVB	
	MC ⁺ 37 44	8,7 x 10 ³ ab
	A.P.	
4	LST ⁺ 35 - EMB 35	7,0 x 10 ³ ab
10	VRBA 35 - CTABL 43	1,9 x 10 ² b
11	DLA 35 - CTABL 43	1,5 x 10 ² b
8	VRBA 35 - EMB 35	1,4 x 10 ² b
9	DLA 35 - EMB 35	9,9 x 10 b
1	LST ⁺ 35 - EC 45,5	2,6 x 10 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

* Ordenação por ordem decrescente das médias

LST = Lauryl Sulfato Triptose; EC = Caldo EC; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose; MC = Mac Conkey; EMB = Eosina Azul de Metileno; VRBA = Vermelho Violeta Bile Ágar; DLA = Desoxicolato Lactose Ágar.

Apesar da aparente semelhança estatística entre os resultados, tendo ocorrido significância de interesse apenas para a técnica nº 2 com relação a nº 1 e às técnicas de presuntivos sólidos, observou-se que uma análise microbiológica do queijo pelas técnicas nºs 2, 5, 7, 6, 3 e 4 teria condenado o produto, já que é estabelecido o limite máximo pelo CNNPA (15) de $10^2/g$, e pelas técnicas nºs 10, 11, 8, 9 e 1, principalmente as duas últimas, o produto estaria apto para o consumo com relação à contaminação fecal. O teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade, revelou ser a média entre as 6 primeiras técnicas (ordem decrescente de valores) superior à média das 5 últimas. Observou-se um elevado coeficiente de variação para o ensaio (48,8%), que provavelmente decorreu da grande variabilidade nos resultados (Tabela 1B do Apêndice) para determinadas técnicas.

Apesar das contagens semelhantes para o grupo coliformes totais e, embora os meios líquidos tenham demonstrado um menor percentual de isolamentos de *Escherichia coli* que os meios sólidos, o Número Mais Provável (NMP), salvo a técnica nº 1, apresentou sempre os maiores índices de contaminação fecal. Tais resultados sugerem um efeito marcante das duas metodologias básicas sobre o padrão determinado. Ressalte-se que, por menor que seja o número de coliformes fecais presente na diluição, sempre haverá uma chance de positividade no NMP, ao passo que no caso dos meios sólidos como presuntivos, o cômputo da contaminação é feito por percentuais de positividade, sobre um determinado número fixo de colônias selecionadas. Somando-se a isso os falso positivos, pa

ra o 1º caso, e falso negativos para o 2º, seria de se esperar menores índices quando meios presuntivos sólidos fossem empregados. Não resta dúvida que elevadas densidades de *Escherichia coli* ou mesmo uma predominância desta na flora total, poderia, teoricamente, amenizar a diferença; no entanto, como já foi demonstrado, não houve esta predominância.

Observando-se também a tabela de médias apresentada, em particular as posições alternadas do presuntivo LST, e sobretudo a inferioridade estatisticamente comprovada com relação ao EC 44,5°C, percebeu-se a influência do procedimento confirmativo para fecais, no índice determinado.

Tomando-se o método NMP, observou-se a rigurosidade do caldo EC a 45,5°C para resultados positivos, contrariando o comportamento geral dos dados. Considerando que das dez amostras estudadas, a *Escherichia coli* foi isolada em todas as dez repetições, quando testada pelas diferentes técnicas, a técnica nº 1 (LST⁺35°C - EC 45,5°C) forneceu apenas 3 resultados positivos, implicando em sete negativos, ou mais corretamente, falso negativos. Em acordo com FISHBEIN *et alii* (24), a técnica foi hábil em não propiciar resultados falso positivos, já que do caldo EC a 45,5°C só foram isoladas culturas de *Escherichia coli* (Tabela 7), entretanto, esse mérito não pode ser supervalorizado quando comparado à frequência de falso negativos. O efeito inibitório da temperatura de 45,5°C sobre a espécie, por alguns autores reportados (4, 18, 29, 70), parece ter implicações maiores quando a cultura não constitui a maior parte da flora de coliformes.

A ligeira superioridade da técnica nº 2 com relação às outras cinco do NMP, torna-se um tanto obscura, sendo mais correto considerar os resultados estatisticamente comprovados. A técnica forneceu dois resultados falso negativos, o que também ocorreu para o LST⁺35°C-CTABL 43°C e BVB⁺37°C-CTABL 43°C, tendo a técnica nº 3, apesar de demonstrado menor percentual de isolamentos de *Escherichia coli*, por parte do presuntivo Mac Conkey, propiciado apenas um. A incidência da frequência de falso negativos tendenciou a um aumento para os casos de utilização do confirmativo EMB, sendo três casos para o LST e três para o BVB, bem como para o VRBA e DLA. As Tabelas 2A e 2B do Apêndice esclarecem melhor os dois últimos parágrafos.

Não se poderia, neste trabalho, mencionar a expressão falso positivo para as técnicas nºs 2, 3, 4, 5, 6 e 7, uma vez que, em apenas três casos, um para o nº 6 e dois para o nº 7, culturas de *Escherichia coli* não foram isoladas, o que poderia ter sido influenciado no momento da seleção das colônias para a identificação. Por outro lado, as cepas recuperadas não foram retestadas em cultura pura e, mesmo se tendo encontrado outras que não a *Escherichia coli* (Tabela 7), não se poderia inferir sobre sua participação na produção de gás.

Através da Tabela 7, verificou-se que a *Enterobacter cloacae* se desenvolveu bem nos caldos e temperaturas confirmativas, salvo a 45,5°C, tendo sido menor o seu isolamento a favor da *Escherichia coli* na técnica nº 3. Provavelmente, a seletividade da água peptonada, ou seja, prova do Indol, tenha contribuído pa

Tabela 7 - Porcentagem de isolamentos obtidos através de diferentes meios confirmativos (NMP/48 horas) para a contaminação fecal

Nº da Técnica	Meios e Temperaturas (°C)	Microorganismos (%)*								Total de Isolamentos
		<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter hafniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	
1	LST 35 [±] EC 45,5	-	-	-	-	-	100	-	-	30
2	LST 35 [±] EC 44,5	-	4	-	-	26	51	2	17	100
3	MC 37 [±] BVB AP 44,0	-	-	1,1	-	13,3	77,8	2,2	5,6	90
4	LST 35 [±] EMB 35	14,3	-	-	-	-	85,7	-	-	70
5	BVB 37 [±] EMB 35	15,7	-	-	-	-	84,3	-	-	70
6	LST 35 [±] CTABL 43	6,7	1,1	-	-	27,8	45,6	14,4	4,4	90
7	BVB 37 [±] CTABL 43	2	6	-	-	34	51	7	-	100
Total		29	11	1	-	97	362	24	26	550
g**		5,3	2	0,2	-	17,6	65,8	4,4	4,7	

* % sobre o total de isolamentos para o gênero e/ou espécie

** % sobre o total de culturas isoladas

LST = Lauryl Sulfato Triptose; EC = Caldo EC; MC = Mac Conkey; AP = Água Peptonada; EMB = Eosina Azul de Metileno; BVB = Bile Verde Brilhante; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose.

ra este resultado. A recuperação de *Pseudomonas* sp. a 44 e 44,5°C está em desacordo com a faixa de temperatura citada para o gênero que é de 0 a 43°C, segundo o manual de BERGEY (8). Algumas *Pseudomonas*, informa COSTA (18), fermentam a lactose com produção de gás, sendo a fermentação do tipo butileno-glicólica. Três, dentre as 27 culturas recuperadas no decorrer do ensaio, escolhidas ao acaso, foram retestadas em todos os meios líquidos e temperaturas, tendo sido observado apenas crescimento, exceto a 45,5°C, onde os tubos mostravam-se límpidos após 48 horas de incubação. O crescimento foi débil em BVB a 44°C e CTABL a 43°C, finda a incubação completa de 48 horas. NEWTON *et alii* (47) observaram o seu crescimento em EMB, o que não foi verificado no presente estudo, talvez por se ter selecionado apenas as colônias escuras com brilho metálico esverdeado, recomendado pela técnica em teste.

POWELL *et alii* (53) informam sobre o isolamento de *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Serratia* em caldo EC a 44,5°C, o que foi constatado para os três primeiros gêneros, neste estudo. Segundo os autores, esses gêneros, quando em culturas puras, mostram-se hábeis para crescer, a esta temperatura. HAJNA & PERRY (29) informam que temperaturas entre 45 e 46°C inibem os tipos *Citrobacter*, concordando com os resultados apresentados na Tabela 7, para o gênero.

A incidência de falso positivos e falso negativos para os confirmativos CTABL 43°C e EMB 35°C foi estudada através das técnicas n^{os} 8 a 11, conforme ilustra a Tabela 8.

Das 200 culturas recuperadas dos meios VRBA e DLA, 46

Tabela 8 - Culturas isoladas dos meios VRBA e DLA que apresentaram resultados positivos em CTABL - 43°C/48 horas e em EMB-35°C/24 horas

Culturas	MEIOS/INCUBAÇÃO			
	CTABL-43°C/48 horas		EMB-35°C/24 horas	
	Total	%*	Total	%**
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	6	16,2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	6,5	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	21,7	-	-
<i>Escherichia coli</i>	30	65,2	31	83,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	4,4	-	-
Não identificada	1	2,2	-	-

* Sobre o total de 46 culturas positivas

** Sobre o total de 37 culturas positivas

foram positivas em CTABL a 43°C, ou seja, apenas 23%. Considerando que 43 cepas de *Escherichia coli* foram isoladas desses meios, 69,8% (30 culturas) forneceram reações positivas e 30,2% (13 culturas), reações falso negativas, percentual este até certo ponto contrabalançado pelo de falso positivas (34,8%). Aplicando-se o mesmo raciocínio para o EMB, constatou-se, apesar de 27,9% de resultados falso negativos, uma superioridade do meio com relação ao CTABL 43°C já que os resultados falso positivos incluíram apenas o gênero *Citrobacter* num índice de 16,2%. Apesar do critério brilho metálico ter conduzido à incidência de falso negativos, uma vez que 27,9% das culturas de *Escherichia coli* isoladas não apresentaram esta característica de colônia, ao se comparar a sua especificidade para a espécie com as demais técnicas, aparenta-se superior embora, conforme as Tabelas 1B e 2B do Apêndice, tenha conduzido, com relativa frequência, ao diagnóstico de ausência de coliformes fecais. Para os casos dos meios líquidos presuntivos seria conveniente bastante cuidado, no momento da seleção das diluições a serem confirmadas, bem como quando da repicagem no meio EMB. O brilho metálico, segundo LÓVINE & SELVA (37) não deve servir de confirmação do microrganismo isolado, entretanto, os dados encontrados neste estudo, fora a dificuldade na distinção entre *Citrobacter freundii*, também observada por HAJNA & PERRY (29), apresentou, seletivamente, resultados satisfatórios para a *Escherichia coli*.

Numa tentativa de identificar a especificidade dos testes para a detecção de *Escherichia coli* típica, as Tabelas 9 e 10

Tabela 9 - IMViC das culturas de *Escherichia coli* isoladas dos meios presuntivos para coliformes totais

IMViC	Biotipo *	Meios (nº de culturas)					Total	%
		LST	BVB	MC	VRBA	DLA		
++--	I (típica)	12	7	6	17	9	51	66,2
--++	II	-	-	-	-	-	-	-
-+(-)+	Intermediário I	-	7	1	5	7	20	26,0
++(-)+	Intermediário II	-	1	-	3	2	6	7,8
Total		12	15	7	25	18	77	100,0

(-) Reações positivas débeis, ocasionalmente são encontradas para o VP.

* Identificação de acordo com a tabela fornecida por THATCHER e CLARK (66)

LST = Lauryl Sulfato Triptose; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; MC = Mac Conkey; VRBA = Vermelho Violeta Bile Ágar; DLĀ = Desoxicolato Lactose Ágar.

Tabela 10. IMViC das culturas de *Escherichia coli* isoladas de diferentes técnicas para a enumeração de coliformes fecais

IMViC	Biotipo*	Meios e Temperaturas (°C) nº de culturas					Total	%
		EC 45,5	EC 44,5	BVB-AP 44°C	CTABL 43**	EMB**		
++--	I (típico)	28	51	70	77	65	291	80,0
--++	II	-	-	-	-	-	-	-
+(-)+	Intermediário I	-	-	-	15	44	59	16,4
++(-)+	Intermediário II	-	-	-	-	10	10	2,8
Total		28	51	70	92	119	360	100

(-) Reações + dêbeis, ocasionalmente são encontradas para o VP

* Identificação de acordo com a tabela fornecida por TATCHER & CLARK (66)

** O quadro não inclui as culturas positivas nos confirmativos dos meios sólidos

** EC = Caldo EC; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; AP = Água Peptonada; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose; EMB = Eosina Azul de Metileno.

foram elaboradas.

Temperaturas de 44,0 e 44,5°C mostraram-se bastante específicas para o biotipo I, ao passo que a 43°C, o intermediário I também se desenvolveu. A temperatura de 45,5°C não foi considerada na discussão, dada a baixa frequência de positividade encontrada. A confirmação em EMB demonstrou medir maior variedade de tipos dos quais dois não são, de acordo com a literatura, perfeitos indicadores da combinação fecal.

O tipo II, considerado também bom indicador e reportado por FISHBEIN (22) como mais resistente a elevadas temperaturas em caldo EC, não foi isolado neste ensaio, parecendo, portanto, não constituir, pelo menos em extensões numericamente consideráveis, a flora coliforme do queijo tipo Minas Frescal. Comparando-se os percentuais de recuperação das técnicas para coliformes totais com as de coliformes fecais, observou-se a tendência das últimas em atuar seletivamente a favor da cultura típica.

A positividade dos meios líquidos em 24 e 48 horas de incubação também foi avaliada, revelando, conforme a Tabela 11, que o CTABL 43°C variou consideravelmente na habilidade de fornecer resultados definitivos em 24 horas, o que já não ocorreu quando culturas puras, provenientes do VRBA e DLA foram testadas. Das 200 culturas puras recuperadas desses meios, apenas uma necessitou incubação por 48 horas. Segundo OSTROLENK & HUNTER (50), a taxa de multiplicação e produção de gás da *Escherichia coli* é acelerada a 43,5°C a 24 horas no caldo Eijkman, pelo visto, o mesmo não ocorre no CTABL em culturas mistas. O caldo EC 44,5°C, revelou-se

Tabela 11 - Número de tubos positivos após 24 e 48 horas de incubação, de acordo com 4 meios líquidos testados para a enumeração de coliformes totais

Nº	Procedimento Confirmativo	Incubação (h)		Diferença	% de positividade após 48 horas
		24	48		
1	EC 45,5°C	29	33	4	12,1
2	EC 44,5°C	166	173	7	4,0
3	BVB 44°C	110	116	6	5,2
6	CTABL 43°C	54	123	69	56,1
		146	250	104	41,6
7	CTABL 43°C	92	127	35	27,6

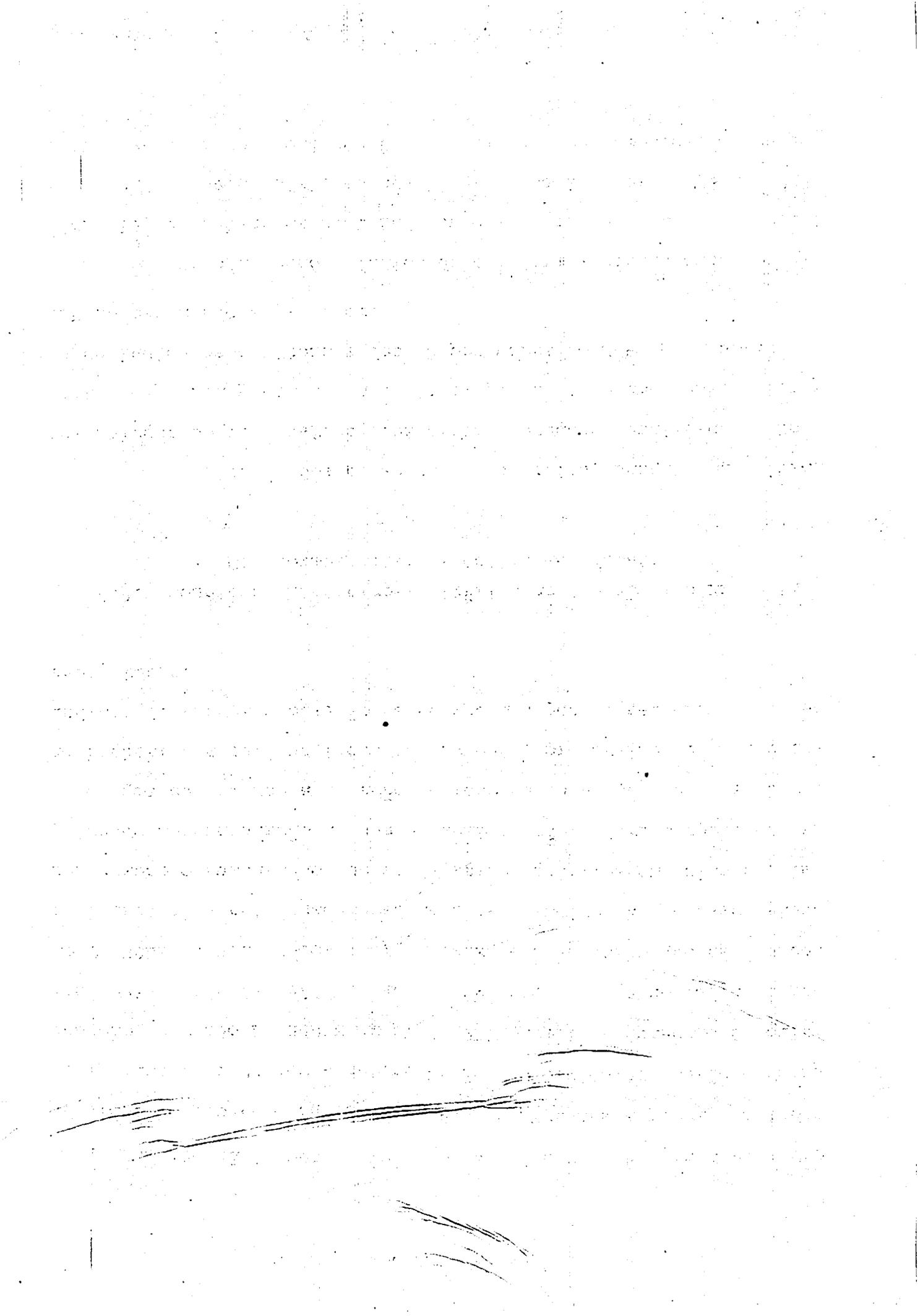
EC = Caldo EC; BVB = Bile Verde Brilhante Lactose; CTABL = Caldo Tamponado de Ácido Bórico Lactose.

relativamente hábil para resultados em 24 horas, bem como em segundo plano, o BVB 44°C cujos resultados acompanham a prova do Indol estipulada para 24 horas de incubação. O prolongado período de incubação, segundo FISHBEIN *et alii* (25) permite a detecção de culturas de *Escherichia coli* que se desenvolvem após 24 horas, no entanto FISHBEIN & SURKIEWICZ (23), apesar de observarem que os índices de *Escherichia coli* aumentaram após as primeiras 24 horas, constataram também o aumento do número de falso positivos em caldo EC, implicando na diminuição de sua especificidade. Seriam oportunos estudos que considerem a relação período de incubação e freqüência de *Escherichia coli* na flora total, onde, provavelmente, elevados índices dentro da população de coliformes possam ser enumerados em menor tempo.

4.3. Condições higiênico-sanitárias do Queijo tipo Minas Frescal (Coliformes totais x Coliformes fecais)

Em função dos presentes resultados, surge uma dúvida com relação ao real estado sanitário do produto analisado. Dois pontos de vista podem ser admitidos, por um lado uma superestimativa do índice de coliformes fecais por parte do NMP, por outro, a CDP subestimando este valor.

Considerando o índice de coliformes totais que foi em média $10^6/g$, a técnica nº 2 indicou que a flora fecal constitui 100% da densidade total, as nºs 5, 6 e 7 de 1% e as nºs 3 e 4, de 0,1%. Para as técnicas nºs 8, 10 e 11 esta contaminação correspon



de a 0,01% e para as n^os 9 e 1 a 0,001%.

Parece pouco provável que se de uma população de *coli* formes, 100% dos gêneros e espécies fossem de origem fecal, baixos níveis de isolamentos de *Escherichia coli* fossem observados nos meios presuntivos, a menos que fatores externos estivessem exercendo uma marcada influência sobre o desenvolvimento nos meios de cultura. Por outro lado, um percentual muito baixo teria, provavelmente, muito poucas chances de recuperação nos meios sólidos presuntivos quando colônias, ao acaso, foram selecionadas.

A presença de *Escherichia coli* constatada indica teoricamente que o alimento foi afetado por uma contaminação fecal, por alguns considerada de origem recente. Entretanto, a elevada incidência de *Enterobacter cloacae* bem como a presença de *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*, entre outras, sugerem uma contaminação por outras fontes, segundo a literatura, ou uma contaminação excretal não recente conforme BARDSLEY (5). A população fecal é considerada por conter elevadas proporções dos biotipos I e II de *Escherichia coli* e o produto em estudo revelou conter a espécie típica e intermediários, não tendo sido recuperado o biotipo II.

Considerando a pouca resistência da *Escherichia coli* aos ambientes fora do trato intestinal e sua pequena participação na microflora total de coliformes, seria conveniente então questionar-se a possibilidade de caracterizar a contaminação fecal do queijo tipo Minas Frescal analisado como de origem não muito recente, ou mesmo uma contaminação de origem considerada não fecal.

Trata-se de pontos obscuros e dúvidas que carecem de mais estudos, necessitando de pesquisas para o esclarecimento.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que o ensaio foi conduzido pode-se concluir que:

Os métodos Número Mais Provável (NMP) e Contagem Direta em Placas (CDP) com inoculação por incorporação, bem como os meios Caldos Lactosado Bile Verde Brilhante 2% (BVB), Lauryl Sulfato Triptose (LST), Mac Conkey (MC) e Agars Vermelho Violeta Bile (VRBA) e Desoxicolato Lactose (DLA) neles empregados, não forneceram em caráter relevante resultados diferentes para a enumeração do grupo coliformes totais, quando aplicados ao queijo tipo Minas Frescal. Os meios BVB, VRBA e EMB (Eosina Azul de Metileno Ágar) mostraram-se idênticos na qualidade de testes confirmativos para o grupo.

Os dados de enumeração do grupo, em sua totalidade, foram diferentes de acordo com o período de incubação, 24 e 48 horas, onde o Caldo Mac Conkey antecipou os resultados.

Os meios LST, BVB, MC, VRBA e DLA apresentaram caracte

terísticas de seletividade semelhantes para o grupo coliformes totais, tendo ocorrido diferenças entre os meios líquidos e sólidos quanto à recuperação de diferentes espécies. O Caldo Mac Conkey a 37°C propiciou menores condições de desenvolvimento da *Escherichia coli* e os meios sólidos apresentaram percentagens de recuperação da espécie, superiores aos meios líquidos.

Os meios sólidos, VRBA e DLA, mostraram-se relativamente hábeis em propiciar resultados qualitativos mais reprodutíveis.

Os métodos Número Mais Provável (NMP) e Contagem Direta em Placas (CDP) com inoculação por incorporação, forneceram resultados diferentes para a enumeração do grupo coliformes fecais. Com exceção da confirmação em EC a 45,5° o NMP conduziu a resultados superiores ao padrão estabelecido pelo CNNPA para o produto e a CDP, a resultados satisfatórios, tal como aconteceu com o EC a 45,5°C.

O Caldo EC a 45,5°C subestimou a população fecal do produto em estudo, apesar de ter demonstrado especificidade para a *Escherichia coli* biotipo I.

Os procedimentos confirmativos, EC a 44,5°C, BVB a 44°C acompanhado de prova de Indol e CTABL a 43°C, permitiram o desenvolvimento de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas* sp., tendo o CTABL a 43°C propiciado também o de *Citrobacter freundii*; entretanto, o maior percentual de isolamentos foi o da *Escherichia coli*, para todos os meios.

Das culturas recuperadas nos meios VRBA e DLA, o CTABL

a 43°C proporcionou 30,2% de resultados falso negativos e 34,8% de falso positivos e o EMB, 27,9 e 16,2%, respectivamente. Os resultados falso positivos em EMB sempre estiveram relacionados ao isolamento de *Citrobacter freundii*, ao passo que para o CTABL, ao de *Enterobacter cloacae* seguido da *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e uma cepa não identificada.

Com exceção à confirmação em CTABL a 43°C e em EMB a 35°C, as demais técnicas demonstraram-se consideravelmente específicas para o biotipo I da espécie *Escherichia coli*.

Dentre os meios líquidos confirmativos, o CTABL a 43°C revelou-se necessitar do prolongado período de incubação de 48 horas, mais do que os demais, para fornecer os resultados definitivos quando as repicagens foram efetuadas através de culturas mistas. Os resultados para a técnica mostraram-se antecipados a 24 horas quando culturas puras foram empregadas.

O produto em estudo demonstrou, apesar da presença de *Escherichia coli* típica, indicando uma contaminação fecal recente, que outras fontes não excretais contribuíram para a sua microflora de coliformes, tendo predominado, através dos percentuais de isolamentos, a espécie *Enterobacter cloacae*.



6. RESUMO

Amostras de queijo tipo Minas Frescal foram analisadas pelo Número Mais Provável (NMP) e pela Contagem Direta em Placas (CDP), visando avaliar a metodologia proposta para a enumeração e isolamento dos microrganismos do grupo coliformes totais e fecais, e o significado dos testes quando aplicados a este produto. Comparação entre a eficiência de diferentes meios líquidos e sólidos também foi realizada, bem como a positividade dos meios líquidos após 24 e 48 horas de incubação. O IMViC das culturas de *Escherichia coli* isoladas foi caracterizado. Os resultados foram trabalhados através de recursos estatísticos e outros, tanto na avaliação quantitativa como na qualitativa dos resultados.

Diferenças acentuadas entre o NMP e a CDP não foram observadas para a enumeração do grupo na sua totalidade. Dentre os caldos testados, do Mac Conkey obteve-se o menor percentual de recuperação de *Escherichia coli*, tendo sido o meio que propiciou maior número de resultados definitivos em 24 horas de incubação. O

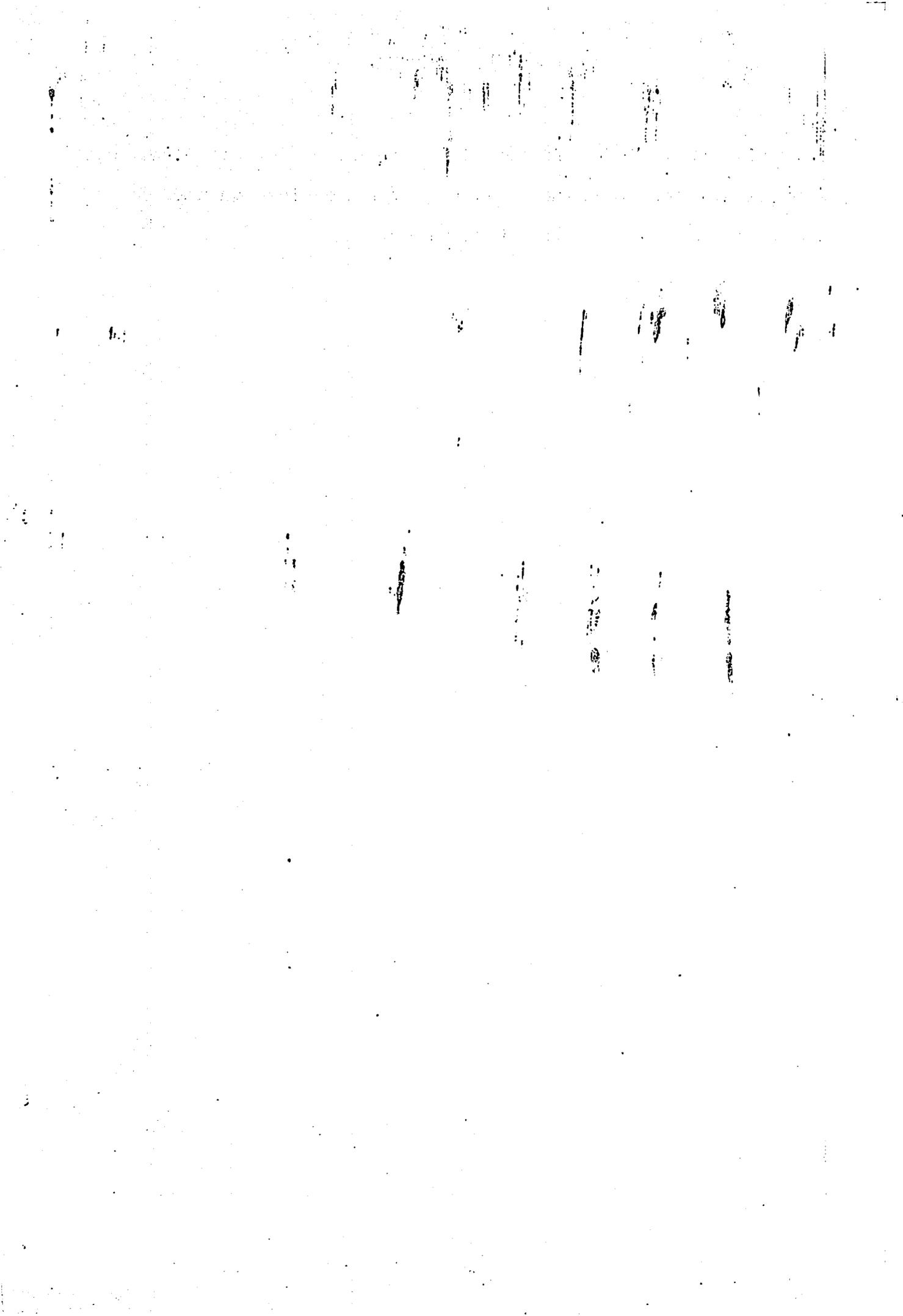
O produto em estudo revelou, através dos meios presuntivos, elevada incidência da *Enterobacter cloacae* e, considerando

Ágar Vernelho Violeta Bile (VRBA) e o Desoxicolato Lactose (DLA) contribuíram com uma percentagem de isolamentos de *Escherichia coli* mais elevada que os meios líquidos. De um modo geral, todos os meios empregados demonstraram a mesma seletividade para os coliformes, tendo ocorrido algumas diferenças quanto aos gêneros e/ou espécies desenvolvidas.

Os resultados diferiram, consideravelmente, quando os coliformes fecais foram estudados. À exceção do caldo EC a 45,5°C, o NMP proporcionou índices maiores que a CDP, onde, pelo primeiro, o produto estaria acima dos limites estabelecidos pela CNNPA. Salvo a confirmação em Eosina Azul de Metileno (EMB) a 35°C e em EC a 45,5°C, foram isolados, além de *Escherichia coli*, o gênero *Enterobacter* dos caldos EC a 44,5°C, Bile Verde Brilhante a 44°C e Tamponado de Ácido Bórico Lactose a 43°C (CTABL) e o gênero *Citrobacter* do CTABL 43°C. Para todos estes também foi recuperado *Klebsiella*. A ocorrência de falso positivos em EMB foi verificada apenas pela presença de *Citrobacter freundii*. O caldo EC a 45,5°C proporcionou elevada frequência de falso negativos apesar de ter demonstrado especificidade para a *Escherichia coli* biotipo I. Outras culturas, além da *Escherichia coli*, produziram gás de CTABL a 43°C, assim como nem todas as cepas desta espécie apresentaram esta habilidade. Não foram isoladas cepas de *Escherichia coli* biotipo II, tendo predominado o tipo I seguido dos intermediários I e II, sendo este último em menor escala.

O produto em estudo revelou, através dos meios presuntivos, elevada incidência da *Enterobacter cloacae* e, considerando

os resultados variados encontrados de acordo com as diferentes técnicas para os coliformes fecais, surgem dúvidas quanto à origem da contaminação a que foi submetido.



7. SUMMARY

Samples of "Minas Frescal" cheese were analysed by the Most Probable Number (MPN) and by Direct Count on Plates (DCP) tests, aiming at assessing the proposed methodology for enumeration and isolation of microorganisms of the group total and fecal coliforms, as well as the signification, of tests when applied to this product. Comparison between, efficiency of different liquid and solid media were also carried out, as well as the positivity of liquid media after 24-and 48 hour incubation. IMViC of *Escherichia coli* cultures isolated were characterized. Results were obtained through statistical and other means, on the basis of both quantitative and qualitative evaluation of methods.

Pronounced differences between MPN and DCP were *not* considered for enumeration of the entire group. Among tested broths, the least percent of *Escherichia coli* recovery was obtained from Mac Conkey's broth, which was the medium that provided the largest number of definitive results within 24-hour incubation. Violet-Red Bile Agar (VRBA) and Lactose Desoxicolate

(DLA) contributed with a higher percent of *Escherichia coli* isolation than liquid media. In general, all of the employed media demonstrated the same selectivity towards the coliforms, some differences having occurred in regards to the developed genera and/or species.

The results differed considerably when fecal coliforms were studied. In contrast to broth EC at 45.5°C, the MPN provided higher indexes than the DCP, where, by the former, the product would be above the limits set by CNNPA, with the exception of Methylene Eosine Blue (EMB) at 35°C and in EC at 45.5°C, besides *Escherichia coli*, genus *Enterobacter* of broths EC at 45.5°C, Brilliant Green Bile at 44°C and Lactose Boric Acid Buffer (CTABL) at 43°C, and genus *Citrobacter* of CTABL at 43°C, were isolated. For all of these, *Klebsiella* was also recovered. Occurrence of false positives of EMB was only noticed by the presence of *Citrobacter freundii*. Broth EC at 45.5°C provided high frequency of false negatives in spite of having shown specificity towards *Escherichia coli* biotype I. Other cultures, besides that of *Escherichia coli*, produced CTABL gas at 43°C, just as not all of the strains of this species have presented this capability. Strains of *Escherichia coli* biotype II were not isolated, type I being predominant, followed by intermediates I and II, the latter in lower rate.

The product under study revealed, by presumptive means, high incidence of *Enterobacter cloacae* and, considering the various results obtained according to the different techniques for the

fecal coliforms, doubts arise as to the origin of the contamination to which it was subjected.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREWS, W.H. *et alii*. Use of two rapid A-1 methods for the recovery of fecal coliforms and *Escherichia coli* from selected foods types. Journal of Food Science, Chicago, 44(1):289-93, 1979.
2. BABEL, F.J. Antibiosis by lactic culture bacteria. Journal of Dairy Science, Champaign, 60(5):815-21, May 1977.
3. BAGLEY, Susan T. & SEIDLER, Ramon J. Significance of fecal coliform-positive *Klebsiella*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 33(5):1141-8, May 1977.
4. BARBER, M.A. The rate of multiplication of *Bacillus coli* at different temperatures. The Journal of Infections Diseases, Chicago, 5(4):379-400, Oct. 1908.
5. BARDSLEY, Doris A. A comparison of two methods of assessing the number of different types of coliform organisms in wa-

- ter. Journal of Hygienic, London, 38(3):309-24, May 1938.
6. BARDSLEY, Doris A. The distribution and sanitary significance of *B. coli*, *B. lactis aerogenes* and intermediate types of coliform bacilli in water, soil, faeces, and ice-cream. Journal of Hygienic, London, 34(1):38-68, Feb. 1934.
 7. EBL manual of products and laboratory procedures. 5. ed. Maryland, 1968. p.106, 155.
 8. BERGEY's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore, The William et Wilkins, 1974. 1250p.
 9. BISSONNETTE, G.K. *et alii*. Evaluation of recovery methods to detect coliforms in water. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 33(3):590-5, Mar. 1977.
 10. _____. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Applied Microbiology, Washington, 29(2):186-94, Feb. 1975.
 11. BLAZEVIC, Donna J. & EDERER, Grace Mary. Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. New York, John Wiley, 1975. 136p.
 12. CHAMBERS, Cecil W. Relationship of coliform bacteria to gas production in media containing lactose. Public Health Reports, Washington, 65(19):619-27, May 1950.
 13. CHORDASH, R.A. & INSALATA, N.F. Incidence and pathological significance of *Escherichia coli* and other sanitary indica

- tor organisms in food and water. Food Technology, Chicago, 32(10):54-63, Oct. 1978.
14. COLLINS, C.H. & LYNE, Patricia M. Microbiological methods. 4. ed. London, Butterworths, 1976. 521p.
 15. COMPÊNDIO de normas e padrões para alimentos. São Paulo, ABIA, 1978. p.ir.
 16. COMPENDIUM of methods for the examination of foods. Washington, APHA, 1976. 70lp.
 17. COPE, Elizabeth J.; DEMPSTER, A.T. & CHAPIN, R.H. A study of additional methods of bacteriological analysis of water. Applied Microbiology, Washington, 3(1):59-61, Jan. 1955.
 18. COSTA, Lelio Joffily Pereira da. Análise bacteriológica da água. João Pessoa, Ed. Universitária, 1979. 464p.
 19. DOCKINS, William S. & MCFETERS, Gordon A. Fecal coliform elevated temperature test: a physiological basis. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 36(2):341-8, Aug. 1978.
 20. EDWARDS, P.R. & ERWING, W.H. Identification of enterobacteriaceae. 3. ed. Minneapolis, Burgess, 1972. 362p.
 21. FERREIRA, Célia Lucia de Lucas Fortes. Valor terapêutico do iogurte e leite acidofilo. Revista do Instituto de Lati-
cínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 34:25-7, mar./abr. 1979.

22. FISHBEIN, Morris. Aerogenic response of *Escherichia coli* and strains of *Aerobacter* in EC broth and selected sugar broths at elevated temperatures. Applied Microbiology, Washington, 10(1):79-85, 1962.
23. _____ & SURKIEWICZ, Bernard. Comparison of the recovery of *Escherichia coli* from frozen foods and nutmeats by confirmatory incubation in EC medium at 44,5 and 45,5 C. Applied Microbiology, Washington, 12(2):127-31, Mar. 1964.
24. FISHBEIN, Morris *et alii*. Coliform behavior in frozen foods. I. Rapid test for recovery of *Escherichia coli* from frozen foods. Applied Microbiology, Washington, 15(2):233-7, 1967.
25. _____ *et alii*. Coliforms, fecal coliforms, *E. coli*, and enteropathogenic *E. coli*. In: SPECK, M.L., ed. Compendium methods for the microbiological examination of foods. Washington, APHA, 1976. Chap. 24, p. 277-300.
26. GALLO, Claudio Rosa. Estudo da microflora de derivados do leite como índice de qualidade. Piracicaba, ESALQ, 1978. 93p. (Tese MS).
27. GELDREICH, E.E. *et alii*. The coliform group. II. reactions in EC medium at 45,5 C. Applied Microbiology, Washington, 6(5):347-8, Sept. 1958.
28. HACKNEY, C.R.; RAY, B. & SPECK, M.L. Repair detection procedure for enumeration of fecal coliforms and *Enterococci* from seafoods and marine environments. Applied and Envi-

- ronmental Microbiology, Washington, 37(5):947-53, May 1979.
29. HAJNA, A.A. & PERRY, C.A. Optimum temperature for differentiation of *Escherichia coli* from other coliform bacteria. Journal of Bacteriology, London, 38(3):275-83, Sept. 1939.
30. HALL, Herbert E.; BROWN, David F. & LEWIS, Keith H. Examination of marked foods for coliform organisms. Applied Microbiology, Washington, 15(5):1062-9, Sept. 1967.
31. HARTMAN, Paul A. The selectivity of autoclave-sterelized violet red bile agar. Food Research, Chicago, 23(5):532-5, Sept./Oct. 1958.
32. _____; HARTMAN, Philip S. & LANZ, Wayne W. Violet red bile 2 agar for stressed coliforms. Applied Microbiology, Washington, 29(4):537-9, Apr. 1975.
33. KERELUK, Karl & GUNDERSON, M.F. Studies on the bacteriological quality of frozen meat pies. II. A comparison of the methods for the enumeration of coliforms. Journal of Milk and Food Technology, Ames, IA, 22(6):176-8, 1959.
34. KILARA, Arun & SHAHANI, Khem M. Lactic fermentations of dairy foods and their biological significance. Journal of Dairy Science, Champaign, 61(12):1793-800, Dec. 1978.
35. LEITÃO, Mauro Faber de Freitas; ROMEU, Airton Pinheiro & Cruz, Ruth Resende. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação. I. Presença no solo, água e vegetais. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4:1-11, 1971/72.

36. LEITÃO, Mauro Faber de Freitas; ROMEU, Airton Pinheiro & CRUZ, Ruth Resende. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação II. Avaliação do teste para caracterização de coliformes fecais. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4:13-21, 1971/72.
37. LÓVINE, Enrique & SELVA, Alejandro Atilio. El laboratorio en la clinica. Medica Panamericana, 1975. 75lp.
38. MACFADDIN, Jean F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980. 527p.
39. MACKENZIE, E.F.W.; TAYLOR, E.W. & GILBERT, W.E. Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli* type I. Journal of General Microbiology, Cambridge, 2(2):197 - 204, 1948.
40. MACKEY, B.M.; DERRICK, Christine M. & THOMAS, Josephine A. The recovery of sublethally injured *Escherichia coli* from frozen meat. Journal of Applied Bacteriology, London, 48(2): 315-24, Apr. 1980.
41. MAXCY, R.B. Non-lethal injury and limitations of recovery of coliform organisms on selective media. Journal of Milk and Food Technology, Ames, IA, 33(10):445-8, Oct. 1970.
42. MC CARTHY, Joseph A.; THOMAS, Harold A. & DELANEY, John E. Evaluation of the reliability of coliforms density tests. American Journal of Public Health, Washington, 48(12):1268-35,

Dec. 1958.

43. MITRUKA, BRIJ M. & BONNER, Mary J. Methods of detection and identification of bacteria. Florida, CRC Press, 1979. 256p.
44. MONTES, Adolfo Leandro. Microbiologia de los alimentos. São Paulo, Ed. Resenha Universitária, 1977. v.1, 576 p.
45. MOSSEL, D.A.A.; VELDMAN, A. & EELDERINK, Ineke. Comparison of the effects of liquid medium repair and the incorporation of catalase in MacConkey type media on the recovery of *Enterobacteriaceae* sublethally stressed by freezing. Journal of Applied Bacteriology, London, 49(3):405-19, Dec. 1980.
46. MOUSSA, R.S. *et alii*. Comparison of five media for the isolation of coliforms organisms from dehydrated and deep, frozen foods. Journal of Applied Bacteriology, London, 36(4):619-24, Dec. 1973.
47. NEWTON, K.G.; HARRISON, J.C.L. & SMITH, K.M. Coliforms from hides and meats. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 33(1):199-200, Jan. 1977.
48. NICKERSON, J.T. & SINSKEY, A.J. Microbiology of foods and foods processing. New York, American Elsevier, 1974. 306p.
49. OLSON, Betty H. Enhanced accuracy of coliform testing in sea water by a modification of the Most-Probable-Number method. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 36(3):

438-44, 1978.

50. OSTROLENK, Morris & HUNTER, Albert C. A comparative study of standard lactose broth and modified Eijkman medium for isolation of *Escherichia coli* from nut meats. Food Research, Chicago, 5(2):141-5, Mar./Apr. 1940.
51. PELCZAR, Michael Joseph; REID, Roger & CHAN, E.C.S. Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água. In: _____ . Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, 1981. v.2, pt. 5, cap. 29, p. 696-7.
52. PERRY, C.A. & HAJNA, A.A. Further evaluation of EC medium for the isolation of coliform bacteria and *Escherichia coli*. American Journal of Public Health, Washington, 34(7):735-7, July 1944.
53. POWELL, James C.; MOORE, Anne R. & GOW, John A. Comparison of EC broth and medium A-1 for the recovery of *Escherichia coli* from frozen chucked snow crab. Applied Microbiology, Washington, 37(5):836-40, May 1979.
54. PULUSANI, S. R. *et alii*. Antimicrobial activity of lactic cultures partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. Journal of Food Science, Chicago, 44(2):575-7, 1979.
55. RAJ, H. & LISTON, J. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. Applied Microbio-

- logy, Washington, 9:171-174, 1961.
56. RAY, B. & SPECK, M.L. Discrepancies in the enumeration of *Escherichia coli*. Applied Microbiology, Washington, 25(4): 494-8, 1973.
57. _____ & _____. Enumeration of *Escherichia coli* in frozen samples after recovery from injury. Applied Microbiology, Washington, 25(4):499-503, 1973.
58. _____ & _____. Planting procedure for the enumeration from dairy products. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 35(4):820-2, Apr. 1978.
59. SHARF, J.M. Índices de sanidade. In: _____. Exame microbiológico de alimentos. São Paulo, Polígono, 1972. cap.16, p. 173-86.
60. SHERWOOD, H.P. & CLEGG, F.L. Further studies of incubation at 44°C as a test for "faecal coli". Journal of Hygienic, London, 42(1):45-54, Jan. 1942.
61. SILLIKER, J.H. & GABIS, D.A. ICMSF methods studies. VII. Indicator tests as substitutes for direct testing of dried foods and feeds for salmonella. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 22(7):971-4, 1976.
62. SILVA, C.A.M.; TIBANA, A. & NAYLOR, H.B. Estudo microbiológico do queijo tipo Minas-Frescal, consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLO-

- GIA, 10, Rio de Janeiro, 1979. Programa-resumos... Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1979. p. 52.
63. STANDARD methods for the examination of dairy products. 10. ed. New York, APHA, 1953. 345p.
64. STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 13. ed. New York, APHA, 1971. p.662-703. 874p.
65. STILES, Michael E. & LAI-KING NG Biochemical characteristics and identification of *Enterobacteriaceae* isolated from meats. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 41(3):639-45, Mar. 1981.
66. TATCHER, F.S. & CLARK, D.S. Microorganisms in foods their significance and methods of enumeration. Toronto, University of Toronto Press, 1968.
67. TAYLOR, C.B. The effect of temperature of incubation on the results of tests for differentiating species of coliform bacteria. Journal of Hygienic, London, 44(2):109-15, Apr. 1945.
68. TENNANT, A.D. & REID, J.E. Coliform bacteria in sea water and shellfish. I. Lactose fermentation at 35,5° and 44°C. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 7(5):731-5, Oct. 1961.
69. THOMAS, J.R., HAROLD A. & WOODWARD, Richard L. Estimation of coliform density by the membrane filter and the fermenta-

tion-tube methods. *American Journal of Public Health*, Washington, 45(11):1431-7, Nov. 1955.

70. VAUGHN, Reese H.; LEVINE, Max & SMITH, Howard. A buffered boric acid lactose medium for enrichment and presumptive identification of *Escherichia coli*. Food Research, Chicago, 16(1):10-9, Jan./Febr. 1951.
71. WARSECK, M.; RAY, B. & SPECK, M.L. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. Applied Microbiology, Washington, 26(6):919-24, Dec. 1973.
72. WOODWARD, Richard L. How probable is the most probable number? Journal of the American Water Works Association, Denver, 49(8):1060-8, Aug. 1957.

APÉNDICE

Tabela 1A - Resumo da análise de variância (quadrados médios) para o grupo coliformes totais. A análise foi feita com dados transformados em logarítmos, após terem sido divididos por 10^4

Causa da Variação	GL	Quadrado Médio
Amostras	9	4,9198
Métodos	4	0,2043*
Resíduo	36	0,0633
CV	%	10%

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 2A - Resumo da análise de variância (quadrados médios) para o grupo coliformes fecais. A análise foi feita com os dados transformados em logarítmo de $(x+2,5)$.

Causa da Variação	GL	Quadrado Médio
Amostras	9	10,3925**
Métodos	10	18,8800**
Resíduo	90	2,5855
CV	%	48,8

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 1B - Índices de contaminação fecal por grama, de acordo com as diferentes técnicas, por amostra de queijo

Amostra nº	LST-EC 45,5°C	LST-EC 44,5°C	LST-EMB 35°C	LST-CTABL 43°C	Mc Conkey BVB/A PEP 44°C	BVB-EMB 35°C	BVB-CTABL 43°C	VRBA-EMB 35°C	VRBA-CTABL 43°C	DLA-EMB 35°C	DLA-CTABL 43°C
1	$1,2 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4$	0	$2,3 \times 10^4$	$4,6 \times 10^2$	$4,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$	0	$1,3 \times 10^3$	0	$1,6 \times 10^3$
2	0	$1,1 \times 10^6$	0	0	$1,5 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$	0	$1,8 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$
3	0	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^2$	0	9×10^6	$1,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	0	$5,8 \times 10^2$	0
4	0	$2,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^2$	$9,3 \times 10^3$	0	$2,10 \times 10^2$	0	4×10^2	0	$2,4 \times 10^2$
5	0	$9,3 \times 10^4$	0	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	0	$2,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	4×10^3	$5,4 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$
6	$2,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	0	$2,3 \times 10^3$	0	0	0	0
7	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	4×10^5	$7,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	7×10^3	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$	$8,25 \times 10^2$	$9,10 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$
8	0	$3,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	3×10^2	6×10^2	0	0
9	0	$9,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^6$	4×10^5	$4,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
10	0	$4,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^3$	4×10^3	$2,8 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$

Tabela 2B - Frequência do isolamento de microrganismos recuperados através de 7 técnicas (NMP) para a enumeração do grupo coliformes fecais

Microrganismo	Métodos (nº de amostras)						
	LST-EC 45,5°C	LST-EC 44,5°C	MC ^{BVB} AP 44°C	LST-EMB 35°C	BVB-EMB 35°C	LST-CTABL 43°C	BVB-CTABL 43°C
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	2	3	2	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	1	-	-	-	1	2
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	7	3	-	-	3	7
<i>Escherichia coli</i>	3	8	9	7	7	8	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	1	1	-	-	4	2
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	3	1	-	-	2	0

À exceção da *Citrobacter freundii*, o número máximo para cada microrganismo não corresponde ao número de amostras em que a espécie foi recuperada.