EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO NA DURAÇÃO
DA “LAG-FASE” DE *Escherichia coli* IZ-923
E *Staphylococcus aureus* IZ-1974.

NELIANE FERRAZ DE ARRUDA

Orientador: ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio, 1982

A Deus agradeço.

Dedico,

aos meus pais

Nelio e Nildes.

Ao meu irmão Nilson

e ao Tadeu,

ofereço.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos mais sinceros:

- Ao Prof.Dr. Antonio Joaquim de Oliveira, pela segura orientação, estímulo e compreensão demonstrados durante a realização deste trabalho.
- Ao Prof.Dr. João Gustavo Brasil Caruso pela colaboração e sugestões apresentadas.
- Ao Prof.Dr. Humberto de Campos, pela orientação na parte estatística.
- Ao Prof.Dr. Rodolpho de Camargo, pela amizade e apoio recebidos.
- À Srta. Lúcia V. Arruda Botelho, bibliotecária-chefe do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e aos funcionários deste mesmo Departamento: Sr. Dirceu Lemaire de Moraes; Sr. José Novaes e Srta. Lúcia Bombo pelos valiosos auxílios prestados.
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio concedido a partir de 1979, na forma de bolsa de estudos e ao Departamento de Tecnologia Rural (ESALQ) pelos recursos oferecidos, sem os quais não seria possível a realização do presente trabalho.
- E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. <u>Escherichia coli</u>	5
2.2. <u>Staphylococcus aureus</u>	11
2.3. Alterações causadas nas células bacteria- nas pelo aquecimento	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. <u>Escherichia coli</u>	29
4.2. <u>Staphylococcus aureus</u>	37
5. CONCLUSÕES	46
6. LITERATURA CITADA	48
7. APÊNDICE	60

LISTA DE TABELAS

Página

1 - Unidades formadoras de colonias (UFC) de <u>E.coli</u> IZ-923 após aquecimento a 50, 55 e 60 ⁰ C por 20 minutos em leite bovino e em extrato de soja e incubação a 32 ⁰ C	61
2 - Unidades formadoras de colonias (UFC) de <u>S. aureus</u> IZ-1974, após aquecimento a 50, 55 e 60 ⁰ C por 20 minutos em leite bovino e em extrato de soja e incubação a 32 ⁰ C.....	62
3 - Logaritmo das unidades formadoras de colonias (UFC) de <u>E. coli</u> IZ-923 após aquecimento a 50, 55 e 60 ⁰ C por 20 minutos em leite bovino e em extrato de soja e incubação a 32 ⁰ C.....	63
4 - Logaritmo das unidades formadoras de colonias (UFC) de <u>S. aureus</u> IZ-1974 após aquecimento a 50, 55 e 60 ⁰ C por 20 minutos em leite bovino e em extrato de soja e incubação a 32 ⁰ C	64

- 5 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de E. coli IZ-923, após tratamento térmico a 50⁰C por 20 minutos..... 31
- 6 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de E. coli IZ-923, após tratamento térmico a 55⁰C por 20 minutos 32
- 7 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de E. coli IZ-923, após tratamento térmico a 60⁰C por 20 minutos 34
- 8 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de S. aureus IZ-1974 , após tratamento térmico a 50⁰C por 20 minutos . 38
- 9 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de S. aureus IZ-1974, após tratamento térmico a 55⁰C por 20 minutos.. 39
- 10 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de S. aureus IZ-1974, após tratamento térmico a 60⁰C por 20 minutos.. 41

11 - Teste das Ordens assinaladas (WILCOXON, 1945) (Quadro Resumo)	42
12 - Duração da "lag-fase" para <u>E. coli</u> e <u>S.aureus</u> após o aquecimento a 50, 55 e 60 ⁰ C/20 minutos em leite bovino e em extrato de soja	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Curva de crescimento de <u>E. coli</u> IZ-923 após aquecimento a 50 ⁰ C por 20 minutos	65
2 - Curva de crescimento de <u>E. coli</u> IZ-923 após aquecimento a 55 ⁰ C por 20 minutos	66
3 - Curva de crescimento de <u>E. coli</u> IZ-923 após aquecimento a 60 ⁰ C por 20 minutos	67
4 - Curva de crescimento de <u>S. aureus</u> IZ-1974 após aquecimento a 50 ⁰ C por 20 minutos.....	68
5 - Curva de crescimento de <u>S. aureus</u> IZ-1974 após aquecimento a 55 ⁰ C por 20 minutos	69
6 - Curva de crescimento de <u>S. aureus</u> IZ-1974 após aquecimento a 60 ⁰ C por 20 minutos	70

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO NA DURAÇÃO DA "LAG-FASE" DE Escherichia coli IZ-923 E Staphylococcus aureus IZ-1974.

Candidata: Neliane Ferraz de Arruda

Orientador: Antonio Joaquim de Oliveira

RESUMO

No presente trabalho foi feito um estudo da duração da "lag-fase" de Escherichia coli IZ-923 e Staphylococcus aureus IZ 1974 após serem submetidos aos tratamentos térmicos de 50, 55 e 60⁰C em leite bovino e em extrato de soja por 20 minutos.

Após o aquecimento, a taxa de crescimento, o número de gerações e o tempo de geração foram determinados pelo cultivo de E. coli e S. aureus a 32⁰C no mesmo meio de aquecimento e semeados em nutriente agar com extrato de levedura. As unidades formadoras de colônia após incubação a 32⁰C por 48 horas foram utilizadas para calcular o tempo de geração, número de gerações e taxa de crescimento em ambos os substratos.

Considerando que durante o período de "lag-fase" os parâmetros acima mencionados permanecem praticamente constante

tes, os resultados deste estudo mostram que, para a E. coli IZ-923 a extensão da "lag-fase" em leite bovino esteve entre 1 1/2 a 2 horas e entre 3 a 4 horas após o aquecimento de 50°C/20 minutos e 55 a 60°C/20 minutos respectivamente.

No extrato de soja, a duração da "lag-fase" esteve entre 2 a 3 horas para os tratamentos térmicos.

Para o S. aureus IZ-1974, não foi evidenciado o período de "lag-fase" após o aquecimento a 50°C/20 minutos em ambos os substratos, demonstrando que esse tratamento térmico não foi suficiente para danificar células vegetativas dessa bactéria. Porém uma "lag-fase" entre 1 1/2 e 2 horas para os tratamentos térmicos de 55 e 60°C/20 minutos, em ambos os substratos foi observada.

HEAT-TREATMENT EFFECT ON THE EXTENT OF "LAG-PHASE" OF Escherichia coli IZ-923 AND Staphylococcus aureus IZ-1974.

Candidate: Neliane Ferraz de Arruda

Adviser: Antonio Joaquim de Oliveira

SUMMARY

The present work was undertaken to study the extent of the "lag-phase" of Escherichia coli IZ-923 and Staphylococcus aureus IZ-1974 after being heated at 50, 55 and 60°C in bovine milk and soybean extract for 20 minutes.

After heating, the growth rates, number of generations and generation time were determined by culturing E.coli and S. aureus at 32 C in the same media of heating and plating on nutrient agar fortified with yeast extract. The colony forming unit after incubation at 32 C were used to calculate the generation time, number of generations and growth rates in both substrates.

Considering that during the "lag-phase" period the parameters above mentioned remaining practically constant, the results of the study show that for E.coli IZ-923 the "lag-phase" extent in bovine milk were between 1 and 1 1/2 hour, and 2 and 3

hours after heating at 50 C for 20 minutes, and 55 and 60 C for 20 minutes respectively.

In soybean extract, the "lag-phase" duration was between 2 and 3 hours for all heating treatments.

For S. aureus IZ-1974 no "lag-phase" period was evident after heating at 50 C for 20 minutes in both substrates showing that this heat treatments was not sufficient to injury the S. aureus vegetative cells. But a "lag-phase" between 1 and 1 1/2 hours for the heating treatments at 55 and 60 C for 20 minutes in both media was observed.

1. INTRODUÇÃO

O calor é um dos meios físicos mais empregados na conservação de alimentos com a finalidade de inibir ou retardar a atividade dos microrganismos presentes. A destruição ou inativação dos microrganismos pelo calor se dá pela desnaturação de proteínas ou enzimas responsáveis por processos vitais da célula microbiana, como reprodução e respiração.

Por outro lado, a destruição dos microrganismos pelo calor úmido, segue sempre uma função logarítmica, isto é, ao final do tratamento térmico, ter-se-á sempre a probabilidade de uma certa fração da população microbiana presente sobreviver a esse tratamento. Desta forma, quando um tratamento térmico sub-letal for utilizado na cocção de um alimento, como acontece em bares, restaurantes e mesmo nas preparações caseiras, as células microbianas serão apenas danificadas e não destruídas, o que provocará tão somente um retardamento no processo de multiplicação.

Como se sabe, a curva de crescimento de uma população microbiana (células vegetativas) pode ser dividida em quatro fases principais: "lag-fase" ou fase de crescimento nulo, durante a qual a multiplicação celular quase não acontece, embora a célula microbiana apresente um intenso metabolismo. Nesta fase, enquanto o microrganismo se adapta ao meio, há produção de enzimas e aumento de tamanho da célula; fase logarítmica ou exponencial, durante a qual a multiplicação celular é acelerada, havendo um aumento rápido da população microbiana; a fase estacionária, onde o número de células viáveis é constante em seu valor máximo; fase de morte ou declínio, onde a contagem de células viáveis diminui, seja por exaustão do meio em nutrientes ou por ação de certos metabólitos tóxicos produzidos pelos próprios microrganismos (STANIER et alii, 1969; PELCZAR et alii, 1980).

A maior ou menor duração de cada uma dessas fases vai depender primordialmente das características dos microrganismos presentes (células vegetativas), da composição química e estado físico do alimento e das condições em que o alimento for mantido.

Como os alimentos se constituem em excelentes substratos para o desenvolvimento dos microrganismos, aquelas células que não foram destruídas, mas simplesmente danificadas,

poderão multiplicar-se quando as condições do meio, tais como temperatura de armazenamento e tempo de permanência nas prateleiras dos supermercados, forem favoráveis.

De uma maneira geral, qualquer modificação no ambiente poderá provocar uma variação na duração da "lag-fase" dos microrganismos presentes e conseqüentemente na vida útil do alimento tornando-o impróprio ao consumo humano, devido a modificação de suas características organoléticas ou presença de toxinas, que porão em risco a saúde do consumidor.

Como as infecções e as intoxicações alimentares estão relacionadas com um maior ou menor número de microrganismos, e a potencialidade das toxinas produzidas por esses microrganismos, é de se supor que, quanto mais longa for a "lag-fase" dos microrganismos sobreviventes ao tratamento térmico a que foi submetido o alimento tanto menores serão as possibilidades de transmissão de patógenos via-alimentos. Assim, o conhecimento da duração da "lag-fase" daqueles microrganismos mais comumente envolvidos em infecções e intoxicações alimentares, toma uma importância bastante grande do ponto de vista de saúde pública.

O presente trabalho, teve como objetivo principal, a determinação da "lag-fase" de Escherichia coli IZ-923 e Staphylococcus aureus IZ-1974, após serem submetidos a diferentes tratamentos térmicos em leite bovino e em extrato de soja. Foi

ram determinados através o tempo de geração (T.G.), o número de gerações (N) e a taxa de multiplicação ou crescimento (K) para os dois microrganismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Escherichia coli

As bactérias pertencentes ao gênero Escherichia são organismos que estão largamente distribuídos na natureza e normalmente são encontrados no trato intestinal dos homens e dos animais. Constituem um grupo grande da família Enterobacteriaceae e de acordo com o Manual de Bergey (BUCHANAN et alii, 1974) as diferentes espécies de Escherichia são as seguintes: Escherichia coli, que não utiliza o citrato como fonte de carbono e não produz sulfeto de hidrogênio; Escherichia freundii e Escherichia intermedium, sendo que a primeira produz sulfeto de hidrogênio e a segunda não.

A Escherichia é um gênero com grande número de linhagens, muitas das quais tem sido associadas com gastroenterite humana devido a sua presença numerosa em alimentos

contaminados. Foi isolada a primeira vez no ano de 1885 (BUCHANAN et alii, 1974) e foi caracterizada em 1886 (MERCHANT, 1950), denominada inicialmente de Bacillus coli e Bacterium coli (BUCHANAN et alii).

A Escherichia coli, geralmente é um bastonete curto, podendo ocorrer tanto isolada como aos pares ou formando cadeias pequenas. Muitas linhagens podem formar cápsulas. São organismos não-esporulados e possuem flagelos peritríquicos (BUCHANAN et alii, 1974).

Em placas de Petri, com meio nutriente agar, as colônias mais jovens dessa bactéria, apresentam-se brancas, às vezes amareladas. Com o passar do tempo, essas colônias vão tornando-se escuras. Elas são úmidas, opacas, circulares de bordas lisas e tornam turvos os meios de cultura líquidos, com sedimentação e não-formação de película. (BUCHANAN et alii, 1974).

Em meios ou substratos contendo glucose, lactose, frutose, galactose, maltose, arabinose, xilose, ramnose e manitol, a Escherichia coli produz ácido e forma gás. Também pode, em alguns casos, fermentar a rafinose, glicerol, sâlicina e outros compostos. Não fermenta a dextrina, o amido, o glicogênio e o inositol. São microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos e exibem um bom crescimento mesmo em meios mais simples. (FRAZIER, 1967).

A temperatura para a Escherichia coli se desenvolver pode variar de 10 a 45⁰C, sendo que seu ótimo se encontra na faixa de 30 a 37⁰C (BUCHANAN et alii, 1974). ASHTON (1950), verificou que a Escherichia coli e outros organismos do grupo coliforme podem se desenvolver a temperaturas de refrigeração, isto é, de 4 a 10⁰C.

A Escherichia coli, juntamente com a Aerobacter aerogenes, são os principais organismos pertencentes ao grupo coliforme (JAWETZ et alii, 1970) e são normalmente utilizados como indicadores da qualidade sanitária dos alimentos porque, além de estarem em grande número no trato intestinal, são de fácil isolamento, pois crescem em meios de cultura simples, e a identificação destes é fácil, além de estarem altamente relacionados com os patógenos intestinais nos alimentos. Segundo FRAZIER (1967) como a Escherichia coli está normalmente presente no trato intestinal do homem e dos animais, e a Aerobacter aerogenes parece estar mais associada aos vegetais (embora ocasionalmente seja encontrada no trato intestinal do homem e animais) é necessário que a incidência de ambas seja determinada em separado, através de testes bioquímicos. Essa determinação é importante quando se quer verificar se houve contaminação fecal em alimentos.

De acordo com FRAZIER (1967), certo número de bactérias coliformes, por suas características, ocupam posições intermediárias entre E. coli e A. aerogenes e se incluem no gênero

Paracolobactrum. Para TATCHER e CLARK (1968) o termo coliformes inclui Escherichia coli e outras enterobactérias, sendo que estas podem ocorrer no solo, ou em produtos de origem vegetal.

Em geral, a presença de coliformes em alimentos, é prejudicial, pois é indício de contaminação fecal e portanto há possibilidade da presença de bactérias enteropatogênicas, e seu crescimento inutiliza os alimentos (FRAZIER, 1967).

Segundo MARTINELLI et alii (1977), a ocorrência de coliformes em um alimento aponta deficiência nas condições sanitárias; e em uma análise microbiológica de carne bovina realizada por estes autores (1977) para verificarem o número de coliformes totais e de Escherichia coli, obtiveram que 96 % dos tubos positivos para coliformes totais, também o eram para essa bactéria.

Segundo BARNARD (1981), os coliformes normalmente estão acompanhados de microrganismos psicrotróficos que podem contaminar o leite após a pasteurização.

A presença de coliformes em queijos normalmente indica que as práticas de elaboração dos mesmos foram inadequadas sob o ponto de vista sanitário (YALE, 1943; ERNSTRON, 1954).

A detecção de bactérias coliformes na manteiga é importante como controle bacteriológico, tanto sob o ponto de vista higiênico, como da conservação do produto, uma vez que, esses microrganismos podem causar alterações no sabor e aroma da manteiga. (GALLO, 1978).

Segundo MACKEY et alii (1980) e INSALATA (1973), além do alimento ser deteriorado pela presença de grande número de Escherichia coli, há também o perigo de algumas linhagens dessa bactéria serem enteropatogênicas, sendo que já houve implicação de certas linhagens destas em casos de gastroenterite humana (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 1978).

Desde o ano de 1968, a Escherichia coli tem sido apontada como uma das causas de diarreia no homem, em qualquer faixa de idade (SACK, 1975).

De acordo com SACK (1975) o modo de ação das linhagens enteropatogênicas de Escherichia coli é o seguinte: esses microrganismos colonizam o intestino delgado, produzindo a toxina termo-lábil, ou a termo-estável, que induz a secreção líquida do fluído, para dentro do intestino.

Entre os alimentos que podem abrigar grande número desses enteropatogênicos se não forem devidamente processados

e/ou conservados, estão o leite e seus derivados pasteurizados, queijos domésticos e importados, molhos congelados e fígado de porco. (GLATZ et alii, 1980).

O tratamento térmico do leite em tanques, ou o emprego do método de pasteurização rápida, normalmente destroem as bactérias coliformes, e quando elas estão presentes em leite pasteurizado, geralmente indicam contaminação pós pasteurização. (BARNARD, 1981). Segundo esse mesmo autor (1981), a contagem total de coliformes em amostras de leite, é um método rápido e fácil para se conseguir informações sobre as condições higiênicas de uma planta de processamento e sobre a vida útil do leite pasteurizado nos locais de distribuição.

Muitos processos utilizados na preservação de alimentos como o congelamento, a própria pasteurização e outros tratamentos que utilizam altas e baixas temperaturas, como a secagem, liofilização, entre outros, podem causar lesões sub-letais em Escherichia coli (MACKEY et alii, 1980). As células sobreviventes a esses tratamentos podem voltar à atividade metabólica normal, se as condições ambientais favorecerem. De acordo com MARCHANT (1950), células de Escherichia coli, normalmente são destruídas após um aquecimento a 60°C por 30 minutos, mas algumas linhagens conseguem resistir a esse tratamento.

2.2. Staphylococcus aureus

O gênero Staphylococcus foi identificado no ano de 1880 por Pasteur em pūs e por Ogston em 1881 (DAVID et alii, 1948). Becker foi o primeiro a conseguir cultura pura desse microrganismo. (BUCHANAN et alii, 1974).

O Staphylococcus sp. pertence à família Micrococcaceae e é representado por duas espécies principais: Staphylococcus aureus e Staphylococcus epidermidis. O primeiro geralmente cresce desenvolvendo coloração que varia da amarela à laranja, sendo que algumas linhagens são incolores; produz coagulase (substância que coagula o plasma sanguíneo), fermenta glucose e manitol sob condições anaeróbicas. O Staphylococcus epidermidis forma colônias esbranquiçadas, não produz coagulase e não fermenta glucose e manitol anaerobicamente. (FRAZIER, 1967). De acordo com BUCHANAN et alii (1974), o gênero Staphylococcus divide-se em três espécies: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis e Staphylococcus saprophyticus. Embora a produção de coagulase seja característica do Staphylococcus aureus, nem todas as linhagens produzem essa substância. (FRAZIER, 1967).

A célula típica do Staphylococcus aureus é um cōcos, gram positivo, que pode ocorrer isolado, aos pares, em cadeias pequenas ou em aglomerações irregulares, semelhantes a cachos de uva. Não são organismos móveis e não formam cápsulas

(FRAZIER, 1967; BUCHANAN et alii, 1974). Em placas de Petri com o meio de cultura nutriente ágar, as colônias são redondas, tendo 1 a 2 milímetros de diâmetro, convexas opacas esfumaceadas, amarelo ouro e essa cor pode variar de intensidade. É uma bactéria aeróbica e/ou anaeróbica facultativa e se desenvolve dentro da faixa de temperatura de 10 a 45°C (BUCHANAN et alii, 1974).

O Staphylococcus aureus é um microrganismo que resiste a altas concentrações de sal, propriedade esta, que é utilizada no preparo de meios seletivos para seu isolamento e cultivo, uma vez que é um mau competidor. A maioria de suas linhagens cresce bem a níveis de 10 % de sal, sendo que alguns toleram concentrações mais altas como 20 % (FRAZIER, 1967; BUCHANAN et alii, 1974).

De acordo com DAVID (1948); MARCHANT (1950) e FRAZIER (1967), o Staphylococcus aureus normalmente se encontra na pele e principalmente na mucosa do sistema respiratório do homem. A maioria dos animais domésticos também podem abrigar essa bactéria e a mastite, causada por esse organismo, em vacas leiteiras é bastante conhecida e se o leite desses animais for consumido ou o queijo dele preparado, as chances de intoxicação são muito grandes. (FRAZIER, 1967).

As bactérias da espécie Staphylococcus aureus são as responsáveis mais comuns pela transmissão de doenças via alimentos, originando uma intoxicação alimentar causada por uma substância extra-celular, designada como enterotoxina, que é produzida no alimento, quando certas linhagens desses microrganismos crescem no mesmo. (FRAZIER, 1967).

A intoxicação alimentar estafilocócica é causada por certas linhagens de Staphylococcus aureus que produzem coagulase na fase de crescimento, porém, isso não significa que todos estafilococos coagulase-positivo sejam necessariamente toxigênicos (FRAZIER, 1967).

Segundo GARCIA et alii (1980), embora a produção de coagulase seja comumente associada para predizer a virulência ou toxidez, não há um critério padrão para determinar qual a intensidade de coagulação que pode ser considerada positiva. Alguns autores consideram que, para a linhagem ser considerada positiva, a coagulação do plasma deve ser total (SPERBER et alii, 1975), enquanto outros, consideram qualquer grau de coagulação como reação positiva.

BERGDOLL (1969), classifica a enterotoxina nos seguintes tipos serológicos: A, B, C, D, E e F e de acordo com FRAZIER (1967) o mais comum de ocorrer é a intoxicação pela to-

xina de tipo A. Segundo PATEE e GLATZ (1980), as enterotoxinas A e D são as que estão mais frequentemente associadas às intoxicações alimentares e a B mais associada às intoxicações transmitidas por falta de cuidado em hospitais.

Os sintomas causados pela intoxicação estafilocócica são náuseas, salivação, vômitos, diarreias, cólicas abdominais, transpirações excessivas, dores de cabeça, prostração e às vezes queda de temperatura. O período de incubação oscila de 1 a 6 horas e esses sintomas geralmente duram de um a dois dias, com baixo índice de mortalidade, e após cessarem os sintomas, a vítima parece não demonstrar imunidade a outro ataque da intoxicação citada. (FRAZIER, 1967; BRYAN, 1973).

O tipo de alimento pode influir na quantidade de enterotoxina produzida como por exemplo, em salmão enlatado, produtos cárneos, creme, produtos lácteos, enfim, as proteínas e amido em abundância parecem estimular a produção de toxina (FRAZIER, 1967). Segundo JAWETZ et alii (1970), em alimentos ricos em carboidratos a produção de enterotoxina estafilocócica é muito frequente.

O cozimento comum de muitos alimentos, não destrói a toxina formada nos mesmos, antes desse preparo; e esses alimentos podem causar envenenamento, mesmo não contendo os microorganismos em questão, vivos. Essa enterotoxina pode suportar

ebulição por até 1 hora ou mesmo uma autoclavagem, embora sua potencialidade diminua gradativamente (FRAZIER, 1967).

De acordo com TROLLER (1976), a faixa ótima de temperatura para o Staphylococcus aureus produzir toxina é de 35 a 39°C.

O Staphylococcus aureus, como todo microrganismo, pode estar sujeito a variações físicas e químicas do meio ambiente, resultando em danos letais ou sub-letais na célula (BUCKER e MARTIN, 1981). O aquecimento, provavelmente é a técnica mais utilizada para esses fins ou para a inativação ou redução da potência de sua toxina (TROLLER, 1976). De acordo com HEINEMANN (1957), o tempo para a destruição térmica do Staphylococcus aureus no leite é de 1,9 minutos a 65°C.

Um aquecimento adequado do leite cru, pode prevenir a produção da enterotoxina termo-resistente, e toda célula viável de Staphylococcus aureus deve ser destruída pela pasteurização do produto, porém o uso de sub-pasteurização como tratamento térmico, em indústrias de queijo, exige cuidados maiores (STILES e WITTER, 1965), uma vez que esse microrganismo é o causador mais comum de envenenamento através de leite e derivados (BLAIR, 1962; SHARPE et alii, 1962).

Staphylococcus sp. são tidos como os mais resistentes microrganismos não-esporulados ao aquecimento (MERCHANT, 1950).

Geralmente, a temperatura de 60°C por 30 minutos a 1 hora, destrói todas as células de Staphylococcus sp., mas algumas, individualmente, podem resistir a um aquecimento de 80°C nesse mesmo período de tempo (BUCHANAN et alii, 1974). São organismos muito resistentes à secagem (MERCHANT, 1950) e linhagens patogênicas normalmente são inibidas pela penicilina e aureomicina, sendo que algumas delas, podem se tornar resistentes, após crescerem em contacto com a penicilina produzindo a penicilinase, enzima que a hidrolisa.

Muitos trabalhos (IANDOLO e ORDAL, 1966; BLUM e ORDAL, 1969; ALWOOD e RUSSEL, 1970; ROSENTHAL e IANDOLO, 1970) demonstraram que, as mudanças que ocorrem em células de Staphylococcus aureus expostas ao aquecimento, são: a precipitação do material intra-celular, a perda dos constituintes celulares e materiais solúveis, o enfraquecimento da membrana celular, entre outras.

De acordo com ALWOOD e RUSSEL (1968) um aquecimento a 60°C, da suspensão dessa bactéria, pode resultar na degradação do seu DNA celular.

Quando vai-se isolar Staphylococcus aureus de alimentos, deve-se levar em conta, o grande número de outros microrganismos que possam estar nesses alimentos sendo necessário portanto, a utilização de um meio de cultura altamente seletivo para tal fim, mas que ao mesmo tempo, não iniba a proliferação daquelas células que sofreram lesões durante o processamento desses alimentos (IDZIAK e MOSSEL, 1979).

De acordo com BUSTA e JEZESKI (1963) o cloreto de sódio pode ser um agente seletivo empregado, embora outros como os antibióticos também possam ser utilizados. (CRISLEY et alii, 1965; ORTH e ANDERSON, 1970). A concentração de cloreto de sódio, normalmente utilizada é de 7,5 % em meios nutritivos para esse fim. (BUSTA e JEZESKI, 1963).

2.3. Alterações causadas nas células bacterianas pelo aquecimento.

As bactérias como qualquer organismo são afetadas pelas mudanças físicas que ocorrem no ambiente em que se encontram. Essas mudanças, tanto podem destruir as células bacterianas, como podem estimular o seu desenvolvimento ou ainda causar danos nas mesmas.

De acordo com RAHN (1945), a ação dos agentes físicos, como o aquecimento ou as radiações, faz com que a célula

perca sua viabilidade e a principal causa da morte da mesma é a mudança química que ocorre no interior da célula.

O mecanismo de morte celular provocado pelo aquecimento é considerado desde 1910, pelos estudos de CHICK e MARTIN, que observando a cinética da coagulação de proteínas, encontraram similaridades entre distribuição da bactéria pelo calor e coagulação de proteínas.

Como os tratamentos que empregam temperaturas muito altas em alimentos podem prejudicá-los quanto à textura, sabor e aroma, nutrientes e outras características, é preciso saber dosá-los, apesar de que alguns microrganismos presentes podem resistir aos mesmos ou ainda podem sofrer apenas danos, dos quais se recuperarão quando as condições ambientais permitirem. Esses processamentos aplicados, tanto podem destruir como não as células microbianas, sendo que neste último caso, há vários graus de danos. As células danificadas necessitam de um período extenso para recuperarem a capacidade de multiplicação.

Segundo STRANGE et alii (1964) e LAMANNA e MALLETE (1953), o que ocorre na célula vegetativa submetida ao aquecimento é: (a) coagulação de proteínas; (b) inativação de enzimas; (c) rompimento dos lipídeos celulares; (d) danos no mecanismo genético; (e) desnaturação do RNA. De acordo com

os resultados obtidos por ORDAL (1971) há um enfraquecimento na membrana citoplasmática que permite que o material do interior da célula saia para o meio, sendo que em Staphylococcus aureus há uma inativação das enzimas celulares com parcial desnaturação das mesmas, enquanto que, em células de Salmonella typhimurium, as células parecem ser estimuladas quanto à atividade metabólica, e a desnaturação da proteína celular parece ser reduzida.

CALIFANO (1952) mostrou que o efeito letal de altas temperaturas em células bacterianas, está relacionado com a perda do ácido ribonucleico na forma solúvel de dentro da célula para o meio, no qual a mesma se acha suspensa.

ALLWOOD e RUSSEL (1967) demonstraram que, células de Staphylococcus aureus aquecidas a 50 e 60°C/30' sofreram perda de amino ácidos da solução intracelular e concluíram que, um dos fatores iniciais que causam danos nessa bactéria é a passagem desses amino ácidos, através da membrana citoplasmática, então danificada, para o meio externo.

RUSSEL e HARRIES (1967), estudando o efeito de várias temperaturas em Escherichia coli obtiveram que, o enfraquecimento da membrana plasmática, deve ser a causa primária de lesões causadas nessa bactéria, e o vazamento do material intracelular parece preceder a morte, quando a célula é aquecida

a 50°C, mas quando uma suspensão dessa bactéria é submetida a fervura, a morte precede essa perda.

Segundo ALLWOOD e RUSSEL (1970) os organismos que sofreram um tratamento térmico sub-letal, necessitam de um longo período para recuperação, ou seja, uma extensa "lag-fase". Geralmente a "lag-fase" de células danificadas é bem maior que a de células não submetidas à agentes causadores de danos.(BUSTA, 1978).

HERSHEY (1939), em uma série de experimentos, estudando a significância fisiológica da demora da multiplicação celular após a lesão térmica, mostra que esse período de latência é progressivamente aumentado com o aumento de temperatura e também sugere que a extensão da "lag-fase" está diretamente relacionada com o grau da lesão, e o resultado da presença na cultura, de células individuais mais resistentes. Concluiu também que, durante a "lag-fase" há regeneração da função respiratória ou reativação das funções metabólicas bacterianas.

De acordo com BUSTA (1978), exposições de células bacterianas a tratamentos térmicos sub-letais podem resultar na perda da habilidade característica destas, crescerem normalmente sob condições que são satisfatórias às células não-tratadas. A lesão, segundo o mesmo autor (1978) é manifestada pela inabilidade dos microrganismos formarem colônias em um

meio de cultura definido como mínimo, enquanto são capazes de formar colônias em meios mais complexos.

Uma extensa "lag-fase" exibida pelas células tratadas, resulta em um crescimento vagaroso, associado a um baixo acúmulo de produtos finais. Em síntese, a lesão celular é observada quando as células sobreviventes perdem algumas de suas propriedades características (BUSTA, 1978). De acordo com PELCZAR et alii (1980), durante a "lag-fase", a população microbiana permanece praticamente constante. A restauração da capacidade de multiplicação celular perdida por ação de qualquer agente do meio externo é identificada como recuperação ou processo de reparo, sendo que, na primeira etapa desse processo as células readquirem sua habilidade de crescer antes da divisão celular normal. (BUSTA, 1978).

Toda célula microbiana que sofreu algum tratamento térmico requer para sua recuperação, um meio rico em nutrientes essenciais e os alimentos principalmente os protéicos como carnes e laticínios satisfazem essa exigência (RUSSEL e HARRIES, 1967).

DUISCHAEVER e JORDAN (1974) aqueceram células de Streptococcus faecium NRC 1261 a 55⁰C por 15 minutos e observaram uma "lag-fase" extensa, ou seja, 5 horas.

CLARK et alii (1968) verificaram que, após aquecerem uma suspensão bacteriana de Streptococcus faecalis R 57 a 60°C por 15 minutos, incubando em meio de cultura "Trypticase Soy Broth", a "lag-fase" foi muito extensa (6 horas) em relação às células não-aquecidas da bactéria em questão, incubadas nas mesmas condições.

DABBAH et alii (1969), utilizando Pseudomonas sp., isolada de leite pasteurizada estocado a 4°C obtiveram que, todas as células, após sofrerem tratamento térmico de 55°C por 30 minutos, foram mortas aparentemente, pois não houve a formação de colônias típicas em meio de cultura adequado (Trypticase Soy Agar) durante a incubação por 48 a 72 horas a 20°C.

ANIC e PROPISIL (1975) estudaram a sobrevivência de Escherichia coli e Proteus spp em salsichas processadas. O estudo foi feito em três tipos de salsichas: "frankfurt" que foi aquecida a 68 e 70°C por 15 e 20 minutos; "especial", aquecida a 65 e 68°C por 50 e 60 minutos; salsichas tipo "chouriço", aquecida a 70 e 72°C por 15 e 20 minutos. Os microrganismos em questão foram incubados nas salsichas, após a esterilização das mesmas, e então foram submetidos aos tratamentos térmicos mencionados. Após a semeadura das amostras das salsichas em Placas de Petri com o meio de cultura adequado, verificaram que não houve sobrevivência dos dois microrganismos utilizados.

SINGH et alii (1975) isolaram 167 linhagens diferentes de Escherichia coli de leite e derivados. Todos os isolados foram submetidos a uma pasteurização no laboratório (63°C por 30 minutos) em leite de vaca desnatado, pelos métodos de tubo e ampolas. O número de linhagens sobreviventes à pasteurização foi determinado pelo crescimento das células tratadas no substrato anteriormente citado. Obtiveram que, pelo método da pasteurização em tubos, 54 linhagens sobreviveram, enquanto que, pelo outro método, apenas 6 linhagens resistiram à pasteurização e destas, constatarem apenas uma linhagem enteropatogênica (0127:B8).

TANNER e WINDSOR (1929) testaram a habilidade de Escherichia coli sobreviver a um tratamento de $62,8^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. As células testadas (4) foram isoladas de fezes e de água condenada ao consumo. Obtiveram que, todas as linhagens foram totalmente destruídas por esse tratamento.

FIRSTENBERG e EDEN (1977) isolaram Staphylococcus aureus de leite de vaca, deixando essa bactéria crescer nesse meio e submetendo-a depois a um tratamento térmico para verificar a temperatura em que a danificação e morte das células ocorreriam. Obtiveram que, em 50 minutos a 75°C , os fenômenos de morte e danificação das células foram observados. Num choque térmico inicial, de $50-60^{\circ}\text{C}$, ocorreu mais a danificação celular.

Acima de 60°C a morte se manifestou mais rapidamente, havendo também células danificadas que em condições ideais se recuperaram. A 70°C, os dois processos: danificação e morte ocorreram com a mesma intensidade.

REITER et alii (1964), estudando os fatores que afetam a multiplicação e sobrevivência de Staphylococcus aureus em queijo tipo "cheddar", obtiveram que, quando esse microorganismo era exposto a temperaturas sub-letais, exibia uma prolongada fase de recuperação ("lag-fase") em todos os meios de cultura utilizados.

Outras manifestações que caracterizam a danificação celular após tratamento térmico, além de uma prolongada "lag-fase" (BUSTA e JEZESKI, 1963; CLARK e ORDAL, 1969; BUSTA, 1978), são: a sensibilidade a agentes seletivos (BUSTA e JEZESKI, 1963; SCHEUSNER et alii, 1971), a degradação do RNA ribossômico (SOGIN e ORDAL, 1967; ROSENTHAL e IANDOLO, 1970; TOMLINS e ORDAL, 1971) e de acordo com ORDAL (1971), o RNA degradado durante o tratamento térmico é re-sintetizado na "lag-fase", antes da célula microbiana iniciar a multiplicação.

De acordo com RUSSEL e HARRIES (1967), as vitaminas contidas em um substrato não aparentam ser importantes para a recuperação de Escherichia coli, porém os amino-ácidos parecem ser altamente importantes. Segundo esses mesmos auto -

res (1967) o uso de extrato de levedura em meios de cultura para recuperação, estimula o reparo das células.

Muitos fatores como a composição do meio de cultura, onde os microrganismos se encontram antes do tratamento térmico, meio de aquecimento do microrganismo, tempo e temperatura de incubação, espécies e variações das linhagens, entre outros, podem influir na resistência térmica das bactérias. (HANSEN et alii, 1963; FARREL e ROSE, 1967; BROWN et alii, 1960; GOMEZ et alii, 1976).

Os sistemas alimentares também influem na resistência dos microrganismos ao aquecimento. KRISHNA-JYENGAR et alii (1957), mostraram que os constituintes do leite e do caldo triptona exercem significativa proteção em células de estreptococos. A importância da variação na quantidade de sólidos em leite, influenciando na resistência de Staphylococcus aureus ao aquecimento, também já é conhecida há muito tempo (KADAN et alii, 1963).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os substratos de aquecimento constituíram-se de leite bovino pasteurizado, adquirido no comércio local e extrato de soja VITAL sem sabor, produzido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL-Campinas, S.P.).

Noventa e nove mililitros de cada substrato foram esterelizados e inoculados com um mililitro das suspensões dos microrganismos Escherichia coli IZ-923 e Staphylococcus aureus IZ-1974, culturas essas, puras e previamente incubadas a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 horas em caldo nutriente sendo que para o S. aureus foi adicionado 7,5 % de cloreto de sódio. (DIFCO MANUAL, 1975).

Os substratos, após a inoculação foram submetidos ao aquecimento às temperaturas de 50,55 e 60°C por 20 minutos, e em seguida resfriados em banho de gelo até $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e mantidos a essa temperatura em estufa. Amostras foram retiradas

a intervalos regulares e após diluições em série, 1 ml da diluição apropriada foi semeado em placas de Petri com nutriente agar + 0,3 % de extrato de levedura para ambas as bactérias.

Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas em estufas por 48 horas a 32°C, após o que foram feitas as contagens de colonias em contador tipo Quebec. Para a E.coli IZ-923, utilizou-se o método de sobre-camadas ("overlay") de semeadura, recomendado por WARSEK (1973).

O número de gerações, tempo de geração e taxa de crescimento de cada microrganismo foram calculados pelas seguintes fórmulas (PORTER, 1946; STANIER et alii, 1969):

$$\text{Número de gerações (N)} = \frac{\log n_1 - \log n_0}{0,301} \quad (\text{gerações}).$$

sendo que n_0 = o número de unidades formadoras de colonias no tempo tomado como inicial e n_1 = o número de unidades formadoras de colonias no tempo final no intervalo considerado.

$$\text{Tempo de geração (TG)} = \frac{\text{Tempo}}{\text{Nº de gerações}} \quad (\text{horas})$$

$$\text{Taxa de crescimento (K)} = \frac{0,692}{\text{T.G.}} \quad (\text{gerações/hora})$$

O tempo de duração da "lag-fase" foi estimado baseando-se nos parâmetros anteriormente descritos (Número de gerações, Tempo de geração e Taxa de crescimento).

Para a comparação do efeito dos substratos utilizados, na multiplicação dos microrganismos, foi feito o Teste das Ordens Assinaladas (WILCOXON, 1945) para dados parecidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se nas Tabelas de 1 a 10. Os números representam valores médios de cinco repetições.

Os resultados do teste estatístico feito para comparação da eficiência dos substratos na recuperação dos microrganismos encontram-se resumidos na Tabela 11.

4.1. Escherichia coli

De acordo com PELCZAR et alii (1980) a população microbiana durante a "lag-fase" permanece temporariamente inalterada. Entretanto isto não significa que as células estejam dormentes ou em repouso, mas sim muito ativas fisiologicamente, sintetizando novo protoplasma, novas enzimas e coenzimas necessárias ao funcionamento da célula na nova condição. Segundo es-

ses mesmos autores (1980) os ajustes relativos ao ambiente físico ao redor da célula exigem tempo, e quando a "lag-fase" chega ao fim, os organismos entram em multiplicação e a população aumenta gradativamente, uma vez que todas as células passam a ter capacidade de divisão em tempos regulares.

Desta forma, no presente trabalho, uma tentativa foi feita para se determinar a duração do tempo de recuperação ("lag-fase") de células de E. coli IZ-923 e S. aureus IZ-1974, após submetidos a diferentes tratamentos térmicos (50, 55 e 60°C/20 minutos) em substratos constituídos por leite bovino e extrato de soja.

Para o tratamento térmico a 50°C por 20 minutos, em leite bovino, o tempo de geração para a E. coli IZ-923 variou de 3,85 a 0,63 horas, o número de gerações de 0,13 a 3,19 gerações e a variação da taxa de crescimento foi de 0,18 a 1,13 gerações/hora no intervalo de tempo estudado (Tabela 5). Em extrato de soja, o tempo de geração variou de 5 a 0,87 horas, o número de gerações de 0,10 a 2,29 gerações e a taxa de crescimento de 0,14 a 0,80 gerações/hora. (Conforme Tabela 5).

Após o tratamento térmico a 55°C por 20 minutos em leite bovino, o tempo de geração variou de 5 a 0,65 horas, o número de gerações de 0,10 a 3,09 gerações e a taxa de crescimento de 0,14 a 1,06 gerações/hora (Tabela 6). Em extrato de so

Tabela 5 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de E. coli IZ-923, após tratamento térmico a 50°C por 20 minutos.

Intervalo de tempo (h)	Leite bovino			Extrato de soja		
	TG	N	K	TG	N	K
0-1/2	3,85	0,13	0,18-	5,00	0,10	0,14
1/2-1	3,85	0,13	0,18	5,00	0,10	0,14
1-1 1/2	3,85	0,13	0,18	5,00	0,10	0,14
1 1/2-2	2,17	0,23	0,32	5,00	0,10	0,14
2-3	1,85	0,27	0,37	2,50	0,40	0,28
3-4	1,20	0,83	0,58	2,13	0,47	0,32
4-6	0,90	2,23	0,77	1,67	1,20	0,41
6-8	0,61	3,26	1,13	0,96	2,09	0,72
8-10	0,63	3,19	1,10	0,87	2,29	0,80

Tabela 6 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de E.coli IZ-923, após tratamento térmico a 55°C por 20 minutos.

Intervalo de tempo (h)	Leite bovino			Extrato de soja		
	TG	N	K	TG	N	K
0- 1/2	5,00	0,10	0,14	16,67	0,07	0,10
1/2- 1	5,00	0,10	0,14	16,67	0,07	0,10
1- 1 1/2	3,85	0,13	0,18	16,67	0,07	0,10
1 1/2- 2	5,00	0,10	0,14	16,67	0,07	0,10
2- 3	5,00	0,20	0,14	5,88	0,17	0,12
3- 4	2,00	0,50	0,35	3,33	0,30	0,21
4- 6	2,50	0,80	0,28	3,03	0,66	0,23
6- 8	1,67	1,20	0,41	1,18	1,69	0,59
8-10	0,65	3,09	1,06	1,01	2,49	0,69

ja, o tempo de geração encontrado para essa bactéria variou de 16,67 a 1,01 horas, o número de gerações de 0,07 a 2,49 gerações e a taxa de multiplicação de 0,10 a 0,69 gerações/hora (Tabela 6).

Na Tabela 7, são encontrados os resultados para o tratamento térmico dessa bactéria a 60°C/20 minutos, os quais mostram que, em leite bovino o tempo de geração variou de 7,14 a 1,06 horas; o número de gerações de 0,07 a 1,89 gerações e a taxa de crescimento de 0,10 a 0,65 gerações/hora. Em extrato de soja a variação para o tempo de geração foi de 16,67 a 1,71 horas; o número de gerações variou de 0,03 a 1,17 gerações e a taxa de crescimento de 0,04 a 0,40 gerações/hora.

Observando esses resultados, pode-se dizer que em todos os tratamentos térmicos empregados, o leite bovino foi o substrato que mais favoreceu a multiplicação de células danificadas de E. coli IZ-923, em comparação com o extrato de soja. Isto foi comprovado pela análise estatística dos resultados obtidos para os dois substratos (Teste das Ordens Assinaladas WILCOXON, 1945 (Tabela 11) que mostraram que o leite bovino foi significativamente superior ao extrato de soja nos três tratamentos térmicos empregados a nível menor que 1 %. Esses resultados concordam com aqueles de OLIVEIRA (1975) que obteve um melhor crescimento de Escherichia coli em um substrato contendo proteína de leite bovino em comparação com

Tabela 7 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de E. coli IZ-923, após tratamento térmico a 60°C por 20 minutos.

Intervalo de tempo (h)	Leite bovino			Extrato de soja		
	TG	N	K	TG	N	K
0- 1/2	7,14	0,07	0,10	16,67	0,03	0,04
1/2- 1	7,14	0,07	0,10	16,67	0,03	0,04
1- 1 1/2	7,14	0,07	0,10	16,67	0,03	0,04
1 1/2- 2	7,14	0,07	0,10	16,67	0,03	0,04
2- 3	10,00	0,10	0,07	14,29	0,07	0,05
3- 4	3,70	0,27	0,19	4,69	0,13	0,16
4- 6	5,00	0,40	0,14	3,77	0,33	0,18
6- 8	3,77	0,53	0,18	5,00	0,40	0,14
8-10	1,06	1,89	0,65	1,71	1,17	0,40

substrato contendo proteína de soja. O fato do leite bovino ter proporcionado uma mais rápida multiplicação de E.coli IZ-923 de acordo com BUCHAMAM e GIBBONS (1974) é devido ser a fermentação da lactose, sua característica principal.

Segundo FRAZIER (1967), quanto menor o tempo de geração, mais rápida será a "lag-fase". Isto levará a um maior número de gerações e a uma taxa de crescimento maior, à medida que as células vão adquirindo condições de se reproduzirem.

Os resultados mostrados nas Tabelas 5 a 7, quando a E. coli IZ-923 foi submetida aos aquecimentos anteriormente descritos, ou seja, 50, 55 e 60°C/20 minutos, concordam com a afirmativa de FRAZIER (1967).

Em relação ao aumento de temperatura, a cada tratamento, observou-se também o aumento do tempo de geração, implicando em um número de gerações menor e também numa menor taxa de crescimento, o que pode ser explicado pela existência de um maior número de células danificadas provocado pelo aumento de temperatura, as quais, segundo BUSTA (1978) podem perder as características de crescimento devido ao emprego de temperaturas sub-letais.

A "lag-fase" ou tempo de recuperação para a E. coli IZ-923, após os diferentes tratamentos térmicos a que foi

submetida em leite bovino, foi de 1 1/2 hora a 2 horas para o aquecimento a 50°C/20 minutos enquanto que para as temperaturas de 55 e 60°C/20 minutos, a duração da "lag-fase" foi basicamente a mesma, estando entre 3 e 4 horas.

Quando esse microrganismo foi submetido aos mesmos tratamentos térmicos mencionados acima, porém em extrato de soja, o tempo de recuperação ("lag-fase") das células danificadas esteve entre 2 e 3 horas para todos os casos, ou seja, aquecimento a 50, 55 e 60°C/20 minutos.

Considerando que, durante a "lag-fase" a população bacteriana permanece constante (PELCZAR et alii, 1980), pode-se sustentar que para os tratamentos em que a "lag-fase" teve o mesmo tempo de duração, o efeito do aquecimento sobre as células microbianas foi praticamente o mesmo, ou seja, a proporção de células danificadas foi semelhante.

Deve ser salientado ainda que, embora o tempo de duração da "lag-fase" para os tratamentos a 55 e 60°C/20 minutos tenha sido o mesmo, quando o substrato de aquecimento foi o leite bovino, houve uma diferença notória entre os outros parâmetros, tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) para os dois tratamentos (Tabelas 6 e 7). Isto pode ser constatado pela diferença entre as unidades formadoras de colônia/ml nos intervalos de tempo considerados. (Tabela 1),

Essa diferença é o resultado de uma maior ação letal do calor sobre as células bacterianas à medida que temperaturas mais elevadas são utilizadas, o que é demonstrado por TANNER et alii (1929), o qual observou que células de E. coli quando aquecidas a $62,8^{\circ}\text{C}$ /30 minutos foram letalmente mais afetadas.

4.2. Staphylococcus aureus

Conforme mostra a Tabela 8, após o tratamento térmico a 50°C por 20 minutos, em leite bovino, o tempo de geração variou de 0,22 a 5 horas, o número de gerações variou de 2,69 a 0,40 gerações e a taxa de crescimento de 2,82 a 0,14 gerações/hora. Em extrato de soja o tempo de geração para essa bactéria, variou de 0,42 a 6,67 horas; o número de gerações entre 0,30 a 2,40 gerações, e a taxa de crescimento de 1,65 a 0,10 gerações/hora.

Quando o tratamento térmico foi de 55°C por 20 minutos em leite bovino, o tempo de geração variou de 3,85 a 0,68 horas, o número de gerações de 0,13 a 2,92 gerações e a taxa de crescimento de 0,18 a 1,98 gerações/hora. Em extrato de soja, o tempo de geração teve uma variação de 5 a 0,65 horas, o número de gerações de 0,10 a 3,06 gerações e a taxa de crescimento de 0,14 a 1,06 gerações/hora (Tabela 9).

Tabela 8 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de S. aureus IZ-1974, após tratamento térmico a 50°C por 20 minutos.

Intervalo de tempo (h)	Leite bovino			Extrato de soja		
	TG	N	K	TG	N	K
0- 1/2	0,76	0,66	0,91	1,67	0,30	0,37
1/2- 1	0,49	1,03	1,41	1,25	0,40	0,55
1- 1 1/2	0,42	1,20	1,65	0,71	0,70	0,87
1 1/2- 2	0,22	2,30	2,82	0,45	1,10	1,54
2- 3	0,32	3,12	2,16	0,53	1,90	1,31
3- 4	0,37	2,69	1,87	0,42	2,40	1,65
4- 6	1,01	1,99	0,69	1,35	1,48	0,51
6- 8	2,00	1,00	0,35	2,56	0,78	0,27
8-10	5,00	0,40	0,14	6,67	0,30	0,10

Tabela 9 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de S. aureus IZ-1974, após tratamento térmico a 55°C por 20 minutos.

Intervalo de tempo (h)	Leite bovino			Extrato de soja		
	TG	N	K	TG	N	K
0- 1/2	3,85	0,13	0,18	5,00	0,10	0,14
1/2- 1	3,85	0,13	0,18	5,00	0,10	0,14
1- 1 1/2	3,85	0,13	0,18	5,00	0,10	0,14
1 1/2- 2	2,50	0,20	0,28	2,78	0,18	0,25
2- 3	2,50	0,40	0,28	3,33	0,30	0,21
3- 4	1,67	0,60	0,41	1,52	0,66	0,46
4- 6	0,68	2,92	1,02	0,65	3,06	1,06
6- 8	0,35	2,89	1,98	1,16	1,73	0,60
8-10	0,68	2,92	1,02	0,72	2,79	0,96

Após o tratamento térmico a 60°C por 20 minutos (Tabela 10), em leite bovino, o tempo de geração variou de 7,14 a 0,68 horas, o número de gerações de 0,07 a 2,92 gerações, e a taxa de crescimento de 0,10 a 1,02 gerações/hora. Em extrato de soja, o tempo de geração variou de 7,14 a 0,70 horas; o número de gerações de 0,07 a 2,85 gerações e a taxa de crescimento de 0,10 a 0,99 gerações/hora.

Em relação aos substratos empregados observou-se que o leite bovino foi o que mais favoreceu a multiplicação das células danificadas de S. aureus IZ-1974 nos tratamentos feitos e isso foi comprovado estatisticamente (Teste das Ordens Assinadas, WILCOXON, 1945), (Tabela 11). Esse resultado concorda com OLIVEIRA (1975) que obteve que o substrato contendo proteína de leite bovino favoreceu mais o crescimento de S. aureus em relação ao substrato contendo proteína de soja.

Observando os resultados (Tabelas 5 a 10), pode-se afirmar que, as células de S. aureus IZ-1974, foram menos danificadas que as de E. coli IZ-923 pelos tratamentos a que foram submetidas, e também as que se recuperaram mais rapidamente, uma vez que apresentaram menores "lag-fases" e tempos de geração; maiores números de geração e taxas de crescimento, tanto para o leite bovino como para o extrato de soja. Esses resultados concordam com MERCHANT (1950) que afirma ser o S. aureus o microrganismo não-esporulado mais resistente a tratamentos térmicos.

Tabela 10 - Tempo de geração (TG), número de gerações (N) e taxa de crescimento (K) de S. aureus IZ-1974, após tratamento térmico a 60°C por 20 minutos.

Intervalo de tempo (h)	Leite bovino			Extrato de soja		
	TG	N	K	TG	N	K
0- 1/2	7,14	0,07	0,10	7,14	0,07	0,10
1/2- 1	7,14	0,07	0,10	7,14	0,07	0,10
1- 1 1/2	7,14	0,07	0,10	7,14	0,07	0,10
1 1/2- 2	3,85	0,13	0,18	4,17	0,12	0,17
2- 3	5,00	0,20	0,14	5,56	0,18	0,12
3- 4	2,86	0,35	0,24	3,70	0,27	0,19
4- 6	2,08	0,96	0,33	2,30	0,87	0,30
6- 8	1,36	1,47	0,51	1,44	1,39	0,48
8-10	0,68	2,92	1,02	0,70	2,85	0,99

Tabela 11 - Teste das Ordens Assinaladas (WILCOXON, 1945)
(Quadro Resumo)

Característica	T	NMS	Efeito do tratamento		
			$\hat{\theta}$	θ_I	θ_S
Log U.F.C.	$t_1 = 55$	$<0,01$	0,285	0,100	0,600
<u>E. coli</u> IZ-923	$t_2 = 55$	$<0,01$	0,210	0,130	0,340
	$t_3 = 55$	$<0,01$	0,160	0,125	0,265
Log U.F.C.	$t_1 = 55$	$<0,01$	0,810	0,320	1,210
<u>S.aureus</u> IZ.1974	$t_2 = 53,5$	$<0,01$	0,120	0,090	0,455
	$t_3 = 55$	$<0,01$	0,230	0,190	0,280

t_1 = aquecimento a 50°C/20 minutos; t_2 = aquecimento a 55°C/20 minutos; t_3 = aquecimento a 60°C/20 minutos; T = soma das ordens das diferenças positivas; NMS = nível mínimo de significância; $\hat{\theta}$ = estimativa do efeito médio de tratamento;

θ_I = limite inferior do intervalo de confiança de θ ;

θ_S = limite superior do intervalo de confiança de θ .

t_1 = aquecimento a 50°C/20 minutos;

t_2 = aquecimento a 55°C/20 minutos;

t_3 = aquecimento a 60°C/20 minutos;

T = soma das ordens das diferenças positivas;

NMS = nível mínimo de significância;

$\hat{\theta}$ = estimativa do efeito médio de tratamento;

θ_I = limite inferior do intervalo de confiança de θ ;

θ_S = limite superior do intervalo de confiança.

Observou-se também que para o S. aureus IZ-1974, conforme mostra a Tabela 8, após o aquecimento a 50°C por 20 minutos, não foi constatada constância no tempo de geração (T.G.), número de geração (N) e taxa de crescimento (K) para os dois substratos utilizados como meio de aquecimento, pois a população aumentou gradualmente nos intervalos considerados. Como a não-variação daqueles parâmetros segundo PELCZAR et alii (1980) é fator de caracterização da "lag-fase", os resultados encontrados indicam a não-existência da mesma, nas condições desse tratamento.

Entretanto, quando se aumentou a temperatura de aquecimento para 55 e 60°C/20 minutos em ambos os substratos utilizados (Tabelas 9 e 10), a diferença de variação dos parâmetros acima mencionados não foi significativa num período de 1 1/2 a 2 horas. Assim sendo, considerou-se que esse foi o tempo de duração da "lag-fase" para os dois tratamentos acima descritos. (Tabela 12).

Observando-se os resultados para os dois microrganismos em ambos os substratos, verificou-se que o número de microrganismos/ml diminuiu com o aumento da temperatura do tratamento térmico. Isso está de acordo com HERSHEY (1939) que observou que um aumento de temperatura influenciou na população microbiana, aumentando seu período de latência.

Tabela 12 - Duração da "lag-fase" para E. coli e S. aureus após o aquecimento a 50, 55 e 60°C/20 minutos em leite bovino e em extrato de soja.

Temperatura do tratamen to (°C)	"Lag-fase" em horas			
	<u>E. coli</u>		<u>S. aureus</u>	
	LB	ES	LB	ES
50	1 1/2 a 2	2 a 3	-*	-*
55	3 a 4	2 a 3	1 1/2 a 2	1 1/2 a 2
60	3 a 4	2 a 3	1 1/2 a 2	1 1/2 a 2

* Não observação de "lag fase" no intervalo estudado.

LB = leite bovino

ES = extrato de soja.

Os resultados encontrados, têm do ponto de vista de saúde pública um significado importante, visto que, esses microrganismos responderam diferentemente aos tratamentos sub-letais.

Desta maneira, para aqueles alimentos que não receberam tratamentos térmicos suficientes para destruir todos os microrganismos presentes, é importante levar em consideração as condições de manuseio e armazenamento dos mesmos, uma vez que, se estas forem favoráveis, esses microrganismos serão capazes de recuperar e se multiplicar, podendo trazer graves problemas à saúde do consumidor.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. O tempo de duração da "lag-fase" de E. coli IZ-923 em leite bovino esteve entre 1 hora e meia e 2 horas após o aquecimento a 50°C/20 minutos e entre 3 e 4 horas, após o aquecimento a 55 e 60°C/20 minutos. Em extrato de soja, a "lag-fase" esteve entre 2 e 3 horas após todos os tratamentos térmicos feitos, para essa bactéria.

2. O S. aureus IZ-1974 não apresentou "lag-fase" em ambos os substratos a 50°C/20 minutos nos intervalos de tempo considerados, porém após os aquecimentos a 55 e 60°C/20 minutos, a "lag-fase para o S. aureus esteve entre 1 hora e meia e 2 horas para ambos os substratos.

3. As células de E. coli comportaram-se diferentemente em relação aos tratamentos térmicos a que foram submetidas nos dois substratos utilizados.

4. Os tratamentos térmicos empregados tiveram o mesmo efeito sobre as células de S. aureus, tanto quando aquecidas em leite bovino como em extrato de soja.

5. A utilização de tratamentos térmicos sub-letais (50, 55, 60°C) no preparo de alimentos contaminados com esses microrganismos poderá resultar em sérias consequências para a saúde do consumidor.

6. Após os tratamentos térmicos a que foram submetidos os dois microrganismos se multiplicaram mais rapidamente em leite bovino do que extrato de soja.

6. LITERATURA CITADA

ALWOOD, M.C. e A.D. RUSSEL, 1967. The leakage of intracellular constituents from heated suspension of Staphylococcus aureus. Experimentia. Basel, 23: 878-879.

ALWOOD, M.C. e A.D. RUSSEL, 1968. Thermal ribonucleic acid degradation and leakage of substances from the metabolic pool in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. Baltimore, 95: 345-349.

ALWOOD, M.C. e A.D. RUSSEL, 1970. Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria. Adv. Appl. Microbiol. New York, 13: 89-119.

ANIC, N. e A. PROPISIL, 1975. Studies on the significance of Escherichia coli and Proteus spp. in heat processed sausages. Technologiya Mesa. Belgrade, 16(7/8): 213-214.

- ASHTON, T.R., 1950. Some bacteriological aspects of the deterioration of pasteurized milk. J. Dairy Res. London, 17 : 261-287.
- BARNARD, S.E., 1981. Correcting coliform problems of pasteurized milk. Dairy Food Sanit., Ames, 1 (1): 16-17.
- BERGDOLL, M.S., 1969. Bacterial toxins in food. Food Technol. Chicago, 23: 530-533.
- BLAIR, J.E., 1962. What is Staphylococcus? . Bacteriol. Rev. Washington, 26: 375-381.
- BLUHM, L. e Z.J. ORDAL, 1969. Effect of sublethal heat on the metabolic activity of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol., Baltimore, 97: 140.
- BROWN, W.L. et alii, 1960. Heat resistance and growth characteristics of microorganisms isolated from semi-perishable can ned hams. Food Res. Chicago, 25: 345-350.
- BRYAN, F.L., 1973. Diseases transmitted by foods. (A classification and Summary). U.S. Department of Health Education and Welfare. Public Health Service. 63 p.

BRYAN, F.L.; K.M. MCNAUGHT e K. BLEHM, 1980. Time-temperature survey at a restaurant that specializes in barbecued food. J. Food Protection. Iowa, 43 (8): 595-600.

BUCHANAN, R.E. e R.E. GIBBONS, eds. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 th Ed. Baltimore, Williams e Wilkins. 1268 p.

BUCKER, E.R. e S.E. MARTIN, 1981. Superoxid bismutase activity in thermally stressed Staphylococcus aureus. Appl. Environment. Microbiol. Washington, 41: 449-459.

BUSTA, F.F., 1978. Introduction to injury and repair of microbial cells. Adv. Appl. Microbiol. Washington, 23: 195-201.

BUSTA, F.F. e J.J. JESESKI, 1963. Effect of sodium chloride concentration in an agar medium on growth of heat-shocked Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. Washington, 11:404-407.

CALIFANO, L., 1952. Liberation d'acide nucleique par les cellules bacterianes sous l'action de la chaleur. Bull. Wed. Heth Org. Geneva, 6: 19-34.

CALHOUN, C.L. e W.C. FRAZIER, 1966. Effect of available water on thermal resistance of three nonsporeforming species of bacteria. Appl. microbiol. Washington, 14: 416-420.

CHICK, H. e C.J. MARTIN, 1910. On the heat coagulation of proteins. J. Physiol. London, 40: 404-430.

CLARK, C.W.; L.D. WITTER e Z.J. ORDAL, 1968. Thermal injury and recovery of Streptococcus faecalis. Appl. Microbiol. Washington, 16: 1764-1769.

CLARCK, C.W. e Z.J. ORDAL, 1969. Thermal injury and recovery of Salmonella thypimuruim and its effects on enumeration procedures. Appl. Microbiol. Washington, 18: 332-336.

CRISLEY, F.D. et alii, 1965. Comparative evaluation of fine selective and differential media for detection and enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. Appl. Microbiol. Washington, 13: 140-146.

DABBAH, R.; W.A. MOATS e J.F. MATTICK, 1969. Factors affecting resistance to heat reconery of heat injured bacteria. J. Dairy Sci. Urbana, Ill, 52: 608-614.

DIFCO LABORATORIES, INC., 1957. Difco. Manual of dehydrated culture media and reagents. 9th ed. Difco Laboratories, Inc. Detroit, Mich. p. 151.

- DUITSCHAEVER, C.L. e D.C. JORDAN, 1974. Development of resistance to heat and sodium chloride in Streptococcus faecium recovering from thermal injury. J. Milk Food Technol. Iowa. 37 (7): 382-386.
- ERNSTROM, C.A., 1954. An early gas defect in pasteurized milk cheddar cheese. Milk Prod. J. Milwaukee, 45: 21-42.
- FARREL, J. e A.H. ROSE, 1967. Thermobacteriology. London, Academic press. p. 147-148.
- FIRSTENBERG, E.R. et alii, 1977. Death and injury of Staphylococcus aureus during thermal treatment of milk. Can J. Microbiol. Ottawa, 23 (8): 1034-1037.
- FRAZIER, W.C., 1967. Food Microbiology. 2a. ed. New York. Mc Graw-Hill. 537 p.
- GALLO, C.R., 1978. Estudo da microflora de derivados do leite como índice de qualidade. Piracicaba, ESALQ/USP. 93 p. (Dissertação).
- GARCIA, M.L.; B. MORENO e M.S. BERGDOLL, 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. Appl. Env. Microbiol. Washington, 39 (3): 548-553.

- GOEPPERT, J.M. et alii, 1968. Behavior of Salmonella typhimurium during manufacture and curing of cheddar cheese. Appl. Microbiol. Washington, 16: 862-866.
- GOMEZ, R.F. et alii, 1976. Effects of inhibitors of protein RNA and DNA synthesis on heat injured Salmonella typhimurium LT-2. J. Gen. Microbiol. Massachusetts, 19: 27-30.
- HANSEN, N.H. e H. RIEMANN, 1963. Factors affecting the heat resistance of nonsporeforming organisms. J. Appl. Bacteriol. London, 26: 314.
- HEINEMANN, B., 1957. Growth and thermal destruction of Micrococcus pyogenes var. aureus in heated and raw milk. J. Dairy Sci., Urbana, 40: 1585-1589.
- HERSHEY, A.D., 1939. Factors limiting bacterial growth. VII. Respiration and growth properties of Escherichia coli surviving sublethal temperature. J. Bacteriol., Baltimore, 38: 563-578.
- HUGES, A. e A. HURST, 1976. Magnesium requirement of Staphylococcus aureus repair from sublethal heat injury. Can J. Microbiol. Ottawa, 22: 1202-1205.

- IANDOLO, J.J. e Z.J. ORDAL, 1966. Repair of thermal injury of S. aureus. J. Bacteriol. London, 91: 134-142.
- IDZIAK, E.S. e D.A.A. MOSSEL, 1979. Enumeration of vital and thermally stussed Staphylococcus aureus in foods using Baird-Parker Pig Plasma Agar (BPP). J. Appl. Bacteriol. London, 48: 101-113.
- INSALATA, N.F., 1973. Enteropathogenic Escherichia coli. A new problem for food industry. Food Technol., Chicago, 27 (5): 56-58.
- INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 1978. Microorganisms in foods. 2ed. Toronto, Univ.of Toronto, v. 1, p. 22-24.
- JAWETZ, G. et alii, 1970. Microbiologia médica. 2a. ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. p. 175-177.
- KADAN, R.S. et alii, 1963. Effects of ingredients used in condensed and frozen dairy products of thermal resistance of potentially patogenic Staphylococcus. Appl.Microbiol, Washin^gyon, 11:45-57.

KRISHNA-JYENGAR, M.K. et alii, 1957. Studies on the heat resistance of some Streptococci. Ind. J. Dairy Sci. India. 10:90.

LAMANNA, L. e M.F. MALLETT, 1953. Basic Bacteriology: Its Biological and Chemical Background. Baltimore, Williams and Wulkins 677 p.

MACKEY, B.M. et alii, 1980. The recovery of sublethally injured Escherichia coli from frozen meat. J. Appl. Bacteriol. London, 48: 315-324.

MARTINELLI, F.A. et alii, 1977. Contagem total de bactérias e enumeração de coliformes em cortes de varejo de carne bovina e em equipamentos de supermercados. Anais da ESALQ. Piracicaba, 34: 231-245.

MERCHANT, I.A., 1950. Veterinary bacteriology and virology. 4th. Ed. Ames, Ia. The Iowa College Press.

OLIVEIRA, A.J., 1975. Growth, heat resistance and survival of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in milk protein and soy protein foods. Ohio, Ohio State University, 139 p. (These Ph.D.).

- ORDAL, Z.J., 1971. Symposium on the restoration of sub lethally impaired bacterial cell in foods. III. Influence of thermal stress. J. Milk Technol. Orange, 34: 548-552.
- ORTH, D.S. e A.W. ANDERSON, 1970. Polymexin coagulase-mannitol agar. 1. A selective isolation medium for coagulase + staphylococci. Appl. Microbiol. Washington, 19: 73-75.
- PATEE, P. e B.A. GLATZ, 1980. Identification of chromosomal determinant of Enterotoxin A production in Staphylococcus aureus. Appl. env. Microbiol. Washington, 39 (1): 186-193.
- PELCZAR, M. et alii, 1980. Microbiologia. São Paulo, Mc Graw Hill do Brasil. V. 2.
- PORTER, J.R., 1946. Bacterial Chemistry and Physiology. New York. John Wiley p. 93-143.
- RAHN, O., 1945. Physical methods of sterilization of microorganisms. Bacteriol. Rev. Washington, 9: 2-47.
- REITER, B. et alii, 1964. Factors affecting the multiplication and survival of coagulase-positive Staphylococci in cheddar cheese. J. Dairy Res. London, 31: 261-272.

- ROSENTHAL, L.J. e J.J. IANDOLO, 1970. Thermally induced intracellular alteration of ribosomal ribonucleic acid. J. Bacteriol. Baltimore, 103: 833-835.
- RUSSEL, A.D. e D. HARRIES, 1967. Some aspects of thermal injury in Escherichia coli. Appl. Microbiol. Washington, 15: 407-410.
- RUSSEL, A.D. e D. HARRIES, 1968. Factors influencing the survival and reirval of heat-treated Escherichia coli. Appl. Microbiol. Washington, 16 (2): 335-339.
- SACK, R.B., 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic E. coli. Ann. Rev. Microbiol. Palo Alto, 28: 333-353.
- SCHEUSNER, D.L. et alii, 1971. Injury of bacteria by sanitizers. Appl. Microbiol. Washington, 21: 41-45.
- SHARPE, M.E. et alii, 1962. Staphylococci and micrococci associated with dairing. J. Appl. Bacteriol. London, 25: 403-415.
- SINGH, R.S. et alii, 1975. Heat-resistant characteristics of Escherichia coli strains isolated from milk and milk products. Exp. Biol. London 13 (1): 96-98.

- SINGH, R.S. e B. RANGANATHAN, 1980. Heat-resistence of Escherichia coli in buffalo milk. J. Food Protection. Iowa, 43 (5): 376-380.
- SOGIN, S.J. e Z.J. ORDAL, 1967. Regeneration of ribosomes and ribosomae ribonucleic acid during of thermal injury to Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. Baltimore, 94 (4): 1082-1087.
- SPERBER, W.H. e S.R. TATINI, 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. Washington, 29: 502-505.
- STANIER, R. Y. et alii, 1969. Mundo dos micrôbios. São Paulo. Edgard Blucher. 741 p.
- STILES, M.E. e L.D. WITTER, 1965. Thermal inactivation, heat injury and recovery of Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci. Urbana, 48: 677-681.
- STRANGE, R.E. et alii, 1964. Effect of magnesium on the permeability control in chilled bacteria. Nature. London, 203: 1034-1035.
- TANNER, F.W. e M.W. WINDSOR, 1929. The ability of Escherichia coli and Serratia marcescens to survive 62, 8⁰C for 30 minutes in milk. J.Dairy Sci. Champaign, 12: 202-210.

- TOMLINS, R.I. e Z.J. ORDAL, 1971. Percursal ribosomal ribonucleic acid and ribosome accumulation in vivo during the recovery of Salmonella thyphimurium from thermal injury. J. Bacteriol. Baltimore, 107: 134-142.
- TROLLER, J.A., 1976. Staphylococcal growth and enterotoxin production factors for control. J. Milk Food Technol. Iowa, 39: 499-503.
- WARSECK, M.B.; B. RAY e M.L. SPECK, 1973. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. Appl. Microbiol. Washington, 26: 919-924.
- WILCOXON, F., 1945. Individual comparison ery ranking methods. Biometries. Fort Collins, 1: 80-83.
- ZINSSER, H., 1948. Textbook of bacteriology, revised by D.T. Smith et alii. 9 ed. New York, Appleton. 992 p.

7. APËNDICE

Tabela 1 - Unidades formadoras de colonias (UFC) de E.coli IZ-923 após aquecimento a 50, 55 e 60°C por 20 minutos em leite bovino e em extrato de soja e incubação a 32°C*.

Tempo (horas)	Leite bovino			Extrato de soja		
	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
0	8 400	6 800	4 470	7 400	5 800	3 710
1/2	9 120	7 240	4 700	8 000	6 025	3 800
1	10 000	7 800	4 900	8 510	6 200	3 900
1 1/2	11 000	8 400	5 200	9 120	7 000	3 980
2	12 900	9 550	5 400	9 800	7 070	4 073
3	15 400	13 500	5 750	12 900	8 000	4 265
4	28 000	23 500	6 920	17 800	9 800	4 700
6	120 000	40 800	9 120	40 800	15 500	5 800
8	1 230 000	94 000	13 200	173 800	50 120	7 800
10	11 220 200	800 000	49 000	851 400	281 900	17 400

*Os números apresentados são valores médios de 5 repetições.

Tabela 2 - Unidade formadora de colônias de S. aureus IZ-1974, após aquecimento a 50, 55 e 60°C por 20 minutos em leite bovino e em extrato de soja e incubação a 32°C*.

Tempo (horas)	Leite bovino			Extrato de soja		
	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
0	24 000	8 320	6 200	16 300	6 300	4 000
1/2	38 900	9 120	6 500	20 000	6 760	4 200
1	79 500	10 000	6 800	50 200	7 250	4 400
1 1/2	182 000	11 000	7 100	81 300	8 130	4 600
2	900 000	12 600	7 800	173 800	10 000	5 000
3	7 800 000	16 600	9 000	645 700	15 140	5 600
4	50 120 000	252 000	11 500	3390 000	24 000	6 800
6	200 000 000	190 000	22 400	9550 000	200 000	12 300
8	400 000 000	1410 000	62 000	16219 000	660 700	32 400
10	525 000 000	8500 000	363 080	20000 000	4590 000	234 000

*Os números apresentados são valores médios de 5 repetições.

Tabela 3 - Logaritmo das unidades formadoras de colonias (UFC) de Escherichia coli IZ-923 após tratamento térmico a 50, 55 e 60°C por 20 minutos e incubação a 32°C em leite bovino e em extrato de soja.

Tempo (horas)	Leite bovino			Extrato de soja		
	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
0	3,92	3,83	3,65	3,87	3,76	3,57
1/2	3,96	3,86	3,67	3,90	3,78	3,58
1	4,00	3,89	3,69	3,93	3,79	3,59
1 1/2	4,04	3,93	3,71	3,96	3,84	3,60
2	4,11	3,98	3,73	3,99	3,85	3,61
3	4,19	4,13	3,76	4,11	3,90	3,63
4	4,44	4,37	3,84	4,25	3,99	3,67
6	5,11	4,61	3,96	4,61	4,19	3,77
8	6,09	4,97	4,12	5,24	4,70	3,89
10	7,05	5,90	4,69	5,93	5,45	4,24

Tabela 4 - Logaritmo da unidade formadora de colônias (UFC) de Staphylococcus aureus IZ-1974, após tratamento térmico a 50, 55 e 60°C por 20 minutos e incubação a 32°C em leite bovino e em extrato de soja.

Tempo (horas)	Leite bovino			Extrato de soja		
	50°C	55°C	60°C	50°C	55°C	60°C
0	4,39	3,92	3,79	4,21	3,80	3,60
1/2	4,59	3,96	3,81	4,30	3,83	3,62
1	4,90	4,00	3,83	4,70	3,86	3,64
1 1/2	5,26	4,04	3,85	4,91	3,91	3,66
2	5,95	4,10	3,89	5,24	4,00	3,70
3	6,89	4,22	3,95	5,81	4,18	3,75
4	7,70	4,40	4,06	6,53	4,38	3,83
6	8,30	5,28	4,35	6,98	5,30	4,09
8	8,60	6,15	4,79	7,21	5,82	4,51
10	8,72	6,93	5,56	7,30	6,66	5,37

Figura 1 - Curva de crescimento de E. coli 1Z-923 após aquecimento a 50°C por 20 minutos

Figura 2 - Curva de crescimento de E.coli IZ 923 após aquecimento a 55°C por 20 minutos.

Figura 3 - Curva de crescimento de E.coli IZ 923 após aquecimento a 60°C por 20 minutos.

Figura 4 - Curva de crescimento de *S. aureus* IZ 1974 após aquecimento a 50°C por 20 minutos.

Figura 5 - Curva de crescimento de S. aureus IZ 1974 após aquecimento a 55°C por 20 minutos.

Figura 6 - Curva de crescimento de S. aureus IZ 1974 após aquecimento a 60°C por 20 minutos.