OCORRÊNCIA DE COLIFORMES E ESTREPTOCOCOS FECAIS
EM ALIMENTOS COM BAIXO TEOR DE UMIDADE

ROSEANE MENDONÇA DE FIGUEIREDO
BACHAREL E LICENCIADA EM QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF. DR. RODOLPHO DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Ciência e Tecnolo
gia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

F475o Figueiredo, Roseane Mendonça de
Ocorrência de coliformes e estreptococos fecais em ali-
mentos com baixo teor de umidade. Piracicaba, 1991.
77p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Alimento - Bacteriologia 2. Alimento - Contaminação
bacteriana 3. Alimento - Teor de umidade 4. Bactéria coli
forme em alimento 5. Estreptococo em alimento I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 576.163

OCORRÊNCIA DE COLIFORMES E ESTREPTOCOCOS FECAIS
EM ALIMENTOS COM BAIXO TEOR DE UMIDADE

Roseane Mendonça de Figueiredo

Aprovada em: 25 de novembro de 1991

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo	LCT/ESALQ
Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira	LCT/ESALQ
Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez	LQI/ESALQ

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

- Orientador -

Ao meus avós Antônio (in memorian) e Augusta (in memorian),
Aos meus pais Manuel e Déa (in memorian),
pelo amor e educação;
e ao meu esposo Mauro,
pelo incentivo, compreensão e amor,

DEDICO

A minha filha Juliana, a quem peço desculpas por todos os momentos de carinho e dedicação que lhe foram poupados para que eu pudesse realizar este experimento agradecendo também a sua tão inocente compreensão, com muito carinho e amor,

OFEREÇO

A Deus por ter me dado saúde, fé, esperança, força e paciência nos momentos mais difíceis,

AGRADEÇO

MULHER

Mulher na raça
mulher da massa
mulher de bossa
mulher da roça
quis crescer
quis subir
e competente,
com a força da mente
sorridente e intransigente,
obstáculos venceu
e cresceu.

E como obstinada
galgando os degraus da vida
ela cumpre o seu papel
de quem sabe o que quer
de quem sabe ser mulher.

(Texto extraído da mesa de uma funcionária de um banco).

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO pela orientação competente, disponibilidade, ensinamentos, compreensão e apoio presta dos na realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. JORGE HORII pelo apoio, compreensão e amizade.
- Ao Prof. Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA por sua boa vonta de, atenção e amizade.
- Aos Prof. Dr. CLAUDIO ROSA GALLO e ao Prof. PAULO CESAR VERTONI, pela presteza e prontidão de ensinamentos.
- Ao Dr. FERNANDO GOMES pelo auxílio nas análises dos testes de hemólise.
- A estagiária ELIZETE RETUCE por sua amizade e grande colabo ração na execução do experimento.
- Aos membros do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroin dustrial pelo apoio recebido.
- Ao Departamento de Estatística pelo auxílio na orientação das análises.
- A ELIANE ALMEIDA pelas revisões gramaticais.
- A PREFEITURA MUNICIPAL DE PIRACICABA pela boa vontade e doação das amostras.

- A SANDRA DE MARCHI VELLO pelos serviços datilográficos.
- A UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA pela liberação das atividades acadêmicas.
- A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.
- A FAPESP pela concessão de auxílio para a realização deste experimento.
- A Beatriz Helena Giocongo pelo auxílio nas revisões bibliográficas.
- A todos os meus amigos que de certa forma me auxiliaram para a realização deste experimento.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	x
ABREVIACÕES	xi
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Alimentos Desidratados	3
2.1.1. Definição	3
2.1.2. Fatores limitantes	3
2.1.3. Aspectos gerais	7
2.2. Estreptococos Fecais	9
2.2.1. Histórico	9
2.2.2. Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos Estreptococos fecais	13
2.2.2.1. <i>S. faecalis</i>	13
2.2.2.2. <i>S. faecium</i>	14
2.2.2.3. <i>S. bovis</i>	14
2.2.2.4. <i>S. equinus</i>	15
2.2.2.5. <i>S. avium</i>	16
2.2.2.6. <i>S. gallinarum</i>	16
2.2.2.7. <i>S. mitis</i>	17
2.2.2.8. <i>S. salivarius</i>	17
2.2.2.9. <i>S. suis</i>	18
2.2.3. Habitat	18

2.2.4. Ocorrência de estreptococos fecais em alimentos	24
2.2.5. Patologia, ocorrência e epidemiologia dos estreptococos fecais	26
2.3. Coliformes	29
2.3.1. Introdução	29
2.3.2. Histórico	30
2.3.3. Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica da <i>E. coli</i>	31
2.3.4. Habitat	34
2.3.5. Ocorrência de coliformes em alimentos ..	36
2.3.6. Patologia, ocorrência e epidemiologia dos coliformes	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Material	44
3.2. Métodos	44
3.2.1. Amostragem	44
3.2.2. Preparo da amostra	45
3.2.3. Contagem presuntiva de enterococos	46
3.2.4. Confirmação dos enterococos	46
3.2.5. Testes bioquímicos realizados para caracterização dos estreptococos	48
3.2.5.1. Teste da catalase	48
3.2.5.2. Hidrólise da arginina	48
3.2.5.3. Hidrólise do hipurato	48

3.2.5.4. Hidrólise da esculina	49
3.2.5.5. Hemólise	49
3.2.6. Teste morfológico	50
3.2.7. Determinação do número mais provável de enterococos por grama de alimento	50
3.2.8. Determinação do número mais provável de coliformes por grama de alimento	51
3.2.8.1. Teste presuntivo para colifor <u>mes</u> mes	51
3.2.8.2. Teste confirmativo para colifor <u>mes</u> mes	53
3.2.9. Determinação de coliformes de origem fe <u>cal</u> cal	53
3.2.10. Teste confirmativo para <i>E. coli</i>	54
3.2.11. Testes bioquímicos realizados para a ca <u>ra</u> racterização da <i>E. coli</i>	54
3.2.11.1. Produção de Indol	54
3.2.11.2. Teste do Vermelho de Metila ..	55
3.2.11.3. Teste de Voges-Proskauer	55
3.2.11.4. Utilização do Citrato	55
3.2.12. Contagem total de microrganismos aeró <u>bios</u> bios	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57

Página

5. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Determinação do número mais provável (NMP) /g usando-se 3 ou 5 tubos de diluição	52
Tabela 2 - Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em biscoito doce	58
Tabela 3 - Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em leite aromatizado	60
Tabela 4 - Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em biscoito salgado	61
Tabela 5 - Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em sopa desidratada	63
Tabela 6 - Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em chocolate em pó	65
Tabela 7 - Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em gelatina	66
Tabela 8 - Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em macarrão	67

ABREVIACÕES

C	- centígrados
kg	- kilogramas
g	- gramas
ml	- mililitro
NMP	- número mais provável
KF	- KENNER Fecal Streptococal-meio para isolamento de estreptococos fecais
BHI	- Brain Heart Infusion - meio para enriquecimento
NA	- nutriente ágar - meio utilizado para conservação das culturas
hs	- horas
min	- minutos
SF	- <i>Streptococcus faecalis</i> broth - meio usado para isolamento de estreptococos
CLST	- Lauryl Sulfate Tryptose Broth - caldo utilizado para enriquecimento de coliformes
BGBL	- Brilhante Green lactose Bile Broth - caldo para isolamento de coliformes totais
EC	- <i>Escherichia coli</i> Broth - caldo para isolamento de coliformes fecais
EMB	- Eosin Methylene - Blue - meio confirmativo de <i>E. coli</i>

OCORRÊNCIA DE COLIFORMES E ESTREPTOCOCOS FECAIS EM ALIMENTOS COM BAIXO TEOR DE UMIDADE

Autor: Roseane Mendonça de Figueiredo

Orientador: Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

RESUMO

O experimento foi conduzido por um período de seis meses no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP - Piracicaba, SP, com o objetivo de se caracterizar a ocorrência de coliformes e estreptococos, além da contagem total de microrganismos aeróbios.

Foram analisados sete diferentes alimentos com baixo teor de umidade, fabricados por diferentes indústrias e que são exclusivamente destinados à merenda escolar, portanto não sendo encontrados à venda no comércio.

Considerando-se que 32,1% das amostras analisadas estavam contaminadas por enterococos e 8,9% por coliformes fecais. Pode-se concluir que os enterococos se comportaram como melhores indicadores e/ou índices quando os alimentos em estudo possuírem baixo teor de umidade.

Entretanto, a ocorrência destas bactérias de origem fecal nos alimentos, não indica necessariamente a ocorrência de patógenos. Porém, pode-se admitir que ocorreu uma contaminação fecal direta ou indireta e que as condições durante o processamento destes alimentos podem ser melhoradas.

OCCURRENCE OF COLIFORMS AND FECAL STREPTOCOCCUS IN FOODS WITH LOW MOISTURE CONTENT

Author: Roseane Mendonça de Figueiredo

Adviser: Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

SUMMARY

The experiment was carried out during six months in the Laboratory of Food Microbiology of the Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial of the Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP - Piracicaba, SP., in order to describe the occurrence of coliforms and *Streptococcus*, besides the total counting of aerobic microorganisms.

Seven different foods with low moisture content produced by different industries and destined exclusively to school lunch, not available commercially, were analysed.

The results made evident an occurrence of 32.1% of enterococcus (8.9% of *Streptococcus faecalis* and 23.2% of *S. faecium*) and 8.9% of fecal coliforms.

However, the occurrence of fecal bacteria in foods cannot conclude accurately the occurrence of pathogenos.

It can be concluded that a fecal contamination occurred, direct or indirect, and the conditions during the food processing, can be improved.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de casos de toxinfecções nas escolas de primeiro grau é significativa e preocupante, uma vez que em crianças estes quadros se apresentam com maior frequência e gravidade.

A multiplicidade de causas envolvidas, tais como a qualidade da água consumida e as condições de higiene, processamento, armazenamento e manipulação dos alimentos usados para o preparo da merenda escolar, tanto nas indústrias como nas escolas, dificulta o diagnóstico preciso da origem desses casos.

Dentre os alimentos usados na merenda escolar, os desidratados, devido à facilidade no preparo, são amplamente empregados. Em razão da baixa atividade de água, estes produutos são altamente estáveis, porém, se, por qualquer causa, absorverem umidade de maneira a elevar sua atividade de água poderão transformar-se em bons substratos para o desenvolvimento de microrganismos.

Além disso, alguns desses produtos não requerem qualquer tipo de cocção prévia à utilização, facilitando a

sobrevida desses eventuais microrganismos.

Certas espécies bacterianas tem seu "habitat" no intestino grosso do homem e dos animais, podendo causar sérios casos de infecção quando esses organismos, se presentes no alimento, são ingeridos.

Neste trabalho, a avaliação do grau de contaminação microbiológica dos alimentos com baixo teor de umidade utilizados no preparo da merenda escolar será feita através do uso de bactérias indicadoras.

Além da *Escherichia coli*, amplamente utilizada com esse propósito, foi pesquisada a ocorrência dos estreptococos fecais, especialmente os enterococos, devido a sua maior resistência em condições adversas.

Frequentemente, a presença de bactérias indicadoras evidencia um tratamento térmico inadequado, contaminação no equipamento e/ou contaminação pós-tratamento térmico.

Os objetivos deste trabalho foi identificar a ocorrência dessas bactérias, realizando um levantamento de informações com o propósito de se fazer uma estimativa da qualidade dos alimentos com baixo teor de umidade distribuídos pela merenda escolar, durante o período de amostragem e estabelecer o melhor índice e/ou indicador de contaminação fecal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Alimentos Desidratados

2.1.1. Definição

A desidratação é um processo combinado de transferência de calor e massa no qual se buscam menores teores de umidade nos alimentos, tendo como principal objetivo o aumento de sua vida útil (CABRAL & ALVIM, 1981).

2.1.2. Fatores limitantes

A relação entre a água disponível e o conteúdo de água certamente irá variar em diferentes alimentos de acordo com a sua capacidade de absorver água, influenciando assim o crescimento microbiano.

A preservação dos alimentos por desidratação baseia-se no fato que os microrganismos e enzimas necessitam de água para a execução de suas atividades (LEITÃO et alii, 1974).

A redução dessa disponibilidade de água faz com que o alimento atinja uma atividade de água capaz de inibir

o crescimento microbiano, atividade enzimica e deterioração de origem física ou química, citados por CABRAL & ALVIM (1981), pois é a atividade de água que determina o menor limite de água disponível para que o alimento tenha sua vida útil aumentada. Em geral, considera-se como 0,6 aw o limite mínimo para o desenvolvimento microbiano (EIROA, 1981).

Segundo EIROA (1981), a maioria das bactérias não se multiplica em condições de atividade de água inferior a 0,91. No entanto, pode ocorrer uma adaptação do microrganismo a atividade de água por diversos fatores, dentre eles a composição química do alimento e a temperatura, que é importante na migração de água durante o armazenamento (TROLLER, 1979). Teoricamente, um sistema fechado, tal como um alimento embalado, deveria eventualmente atingir o equilíbrio. Todavia, se o processo de equilíbrio for demorado áreas com alta atividade de água poderão ocorrer (CABRAL & ALVIM, 1981).

A atividade de água quantifica a relação entre a umidade dos alimentos e a habilidade dos microrganismos crescerem nos mesmos. Embora a desidratação destrua alguns microrganismos, esse processo por si só não é letal (CABRAL & ALVIM, 1981). Muitas espécies de bactérias Gram positivas e negativas podem sobreviver (DELAZARI, 1979). Os problemas microbiológicos encontrados podem ser relacionados com o uso de matéria-prima de baixa qualidade, com a deterioração do produto ou ainda com os microrganismos de significância em saúde pública.

blica (CABRAL & ALVIM, 1981).

Paralelamente às práticas sanitárias que são em pregadas, o controle da temperatura durante o processamento, a rapidez das operações, contaminação no equipamento e/ou contaminação após tratamento térmico desempenham um papel de grande importância na qualidade final do produto, influenciando na flora microbiana que será encontrada em produtos alimentares desidratados.

A utilização crescente das técnicas de desidratação na preservação de alimentos tem motivado estudos que visam avaliar os efeitos desse tratamento sobre a microflora contaminante. Dentre esses efeitos, podemos citar o fenômeno da injúria microbiana.

A injúria microbiana é causada pela ação de agentes físicos ou químicos utilizados na preservação de alimentos, exercendo um efeito deletério visível e provocando injuria das células ou esporos dos microrganismos.

O conceito tradicional de morte de um microrganismo se caracteriza pela incapacidade de multiplicação como um critério de destruição celular irreversível. Entretanto, pesquisas desenvolvidas têm revelado que células aparentemente mortas, quando semeadas em meios de cultivo adequados,

efetua uma reparação de lesões não letais e, após períodos variáveis, as mesmas reassumem as condições normais de crescimento e multiplicação (LEITÃO, 1985). A extensão da injúria celular irá variar principalmente em função do microrganismo e do agente físico ou químico atuando sobre o mesmo. Este fenômeno foi observado em bactérias gram positivas como *S. faecalis* e bactérias gram negativas como a *E. coli*.

Alguns efeitos são decorrentes da ação de agentes físicos e químicos sobre os microrganismos. É provável que este efeito seja menos evidente em bactérias Gram positivas, ao passo que é marcante nas Gram negativas, pois nestas bactérias esse efeito ocorre principalmente na capa externa, "outer envelope", a qual serve de barreira à penetração de substâncias variadas. No caso das bactérias Gram positivas os efeitos maiores parecem ser sobre o ácido teicônico, componente importante da parede celular dessas bactérias. Outros efeitos também podem ocorrer, como danos a membranas citoplasmáticas, ribossomas, DNA e enzimas essenciais (LEITÃO, 1985).

A ocorrência de um ou mais desses danos acarretará no comportamento das células injuriadas consequências tais como:

- maior sensibilidade a presença de componentes tensoativos, sais, antibióticos, corantes e pH;
- perda de componentes ou materiais celulares;
- aumento acentuado da fase lag;

- incapacidade de multiplicação.
- incapacidade de recuperação das células inju
riadas.

2.1.3. Aspectos gerais

Considerando-se que os alimentos desidratados são consumidos diretamente após prévia reidratação ou são empregados como ingredientes no preparo de outros alimentos, torna-se de fundamental importância o conhecimento de seus níveis de contaminação (DELAZARI, 1979).

Karslson & Gunderson (1965), apud LEITÃO & DELA ZARI (1974), demonstraram que a carga microbiana total dos alimentos desidratados é a somatória da carga microbiana de cada componente multiplicada pela porcentagem em peso com que participa na formulação do produto final (FANELLI et alii, 1970).

Foram identificados vários gêneros de bactérias aeróbia provenientes de produtos desidratados, dentre eles *Escherichia* e *Streptococcus*.

A identificação e contagem de bactérias indica
doras, como a *Escherichia coli* e os enterococos, habitantes normais do intestino grosso do homem e animais, é utilizada para indicar a presença de possíveis agentes patogênicos nes

KARSLSON, K.E. & GUNDERSON, M.F. Microbiology of dehydrad soups. II "Ad ding Machine" Approach. Food Technol. 19(1): 86-90, 1965.

se tipo de alimento (CABRAL & ALVIM, 1981), uma vez que vá-
rios gêneros da família *Enterobacteriaceae* podem sobreviver por
longos períodos em produtos alimentícios desidratados (MOSSEL
& SHENNAN, 1976).

Em pesquisa realizada com amostras de alimen-
tos desidratados em relação à presença de bactérias indicado-
ras (enterococos e coliformes), não foram isolados colífor-
mes, ao passo que a presença de enterococos era bastante fre-
quente (LEITÃO & DELAZARI, 1974).

A detecção e contagem de bactérias, do grupo
coliforme, como a *E. coli* e em menor escala os enterococos,
foram considerados para indicar a presença de microrganismos
de significância em Saúde Pública. Recentemente esses micror-
ganismos têm sido sugeridos como indicadores em alimentos de-
sidratados (DONALD, 1974).

DONALD (1974) e LEITÃO (1985) distinguem as
diferentes funções de microrganismos indicadores e índices.
A presença de bactérias indicadoras é considerada como uma
evidência de tratamento térmico inadequado, contaminação no
equipamento e/ou contaminação pós-tratamento térmico, carac-
terizando uma falha no processamento do alimento.

Por outro lado, entende-se que organismos utilizados como índices indicam a possibilidade da presença elevada de organismos patógenos.

Os coliformes fecais são os melhores índices de contaminação fecal, visto que apresentam um "habitat" restrito ao trato intestinal de homens e animais; é raramente encontrados em cavalos, BUTTIAUX & MOSSEL (1961), além de possuir pouco tempo de sobrevivência em outros ambientes. Entretanto os coliformes não são tão resistentes a condições adversas quanto os estreptococos fecais, organismos indicadores em potencial (BANWART, 1989). Os estreptococos fecais, embora não sejam tão específicos em relação ao "habitat", apresentam as características de resistir por mais tempo a condições desfavoráveis, tanto no aspecto físico como no químico (LEITÃO & DELAZARI, 1974).

DONALD (1974) afirma que geralmente há uma boa correlação entre as contagens totais e microrganismos indicadores em alimentos, razão pela qual essa associação é conveniente para avaliar o produto final em relação às condições de tratamento e processamento.

2.2. Estreptococos Fecais

2.2.1. Histórico

Beiroth e Eerlich, em 1877, descreveram a pre

sença de cocos que se apresentavam em cadeias (GUERREIRO et alii, 1984). O gênero *Streptococcus* é formado de 21 espécies, sendo distinguidos por grupos sorológicos (porém nem todas as espécies são patogênicas). Os *Streptococcus* hemolíticos estão associados a vários surtos de infecções e podem ser identificados de acordo com o grupo sorológico, segundo o método originalmente descrito por Lancefield em 1928 (ICMFS, 1978).

Lancefield verificou que os *Streptococcus* hemolíticos podiam ser divididos em grupos utilizando provas de precipitação, empregando um carboidrato específico, denominada substância "C". Esses grupos imunológicos foram designados pelas letras de "A" até "O". (GUERREIRO et alii, 1984).

A substância C do grupo D dos estreptococos é constituída de glicerol.

O grupo D de Lancefield é composto atualmente de 6 espécies: *S. faecium* e sua sub-espécie (*durans*), *S. faecalis* e suas 2 sub-espécies (*liquefaciens* e *zymogenes*), *S. bovis* e *S. equinus* (BANWART, 1989). Buchanam and Gibbons (1974) apud (BANWART, 1989) incluíram o *S. avium* (HARMAN & DEIBEL, 1984) e, mais recentemente, o *S. gallinarum* (BANWART, 1989).

BUCHANAM, R.E. and GIBBONS, N.E. 1974. Bergey's ... 8th Edition Baltimore, Md: The William and Wilkins CO.

SHERMAN, em 1937, classificou os estreptococos em 4 divisões, de acordo com sua fisiologia e características de crescimento, sem considerar o "habitat" ou fonte. Em uma dessas divisões, ficou estabelecido que os enterococos consistiam de 4 espécies: *S. faecalis*, *S. liquefaciens*, *S. zymogenes* e *S. durans* (ICMSF, 1978).

Entretanto, as características fisiológicas de vários estreptococos são uniformes (ICMSF, 1978). Dessa forma, a classificação dos enterococos passou a ser baseada, primeiramente, em suas características sorológicas e, secundariamente, em suas características fisiológicas (HARTMAN & DIEBEL, 1984).

Sherman reorganizou todos os membros dos enterococos de acordo com a sorologia proposta por Lancefield (ICMSF, 1978).

Thiercelin, em 1889, foi o primeiro a utilizar o termo enterococo para descrever um diplococo Gram positivo de origem intestinal. Este termo foi amplamente utilizado pelos bacteriologistas (ICMSF, 1978), mas algumas dificuldades tem ocorrido com o uso desta terminologia.

Algumas distinções podem ser apontadas entre estas categorias a saber: *S. faecium*, juntamente com suas sub-espécies (*liquefaciens* e *zymogenes*), e o *S. faecalis* e sua sub-espécie (*durans*) compreendem o grupo dos enterococos.

Shattock, em 1962, e Diebie, em 1964, incluíram o *S. bovis* e o *S. equinus* no grupo D pelo fato de que foram extraídos antígenos do grupo D das células dessas duas espécies (FACKLAN, 1972). Essas duas espécies e os enterococos formam os estreptococos do Grupo D de Lancefield (DELAZARI, 1979). Buchanan e Gibbons, 1974, (BANWART, 1989), incluíram o *S. avium*, uma espécie que comumente habita o trato intestinal das galinhas e também possuidor dos antígenos do grupo D e Q, sendo fisiologicamente similar aos estreptococos do grupo D. Também o *S. gallinarum* foi incluído no grupo D de Lancefield por possuir o antígeno D. O estreptococo fecal inclui todos os estreptococos do grupo D e *S. mitis* e *S. salivarium*.

Assim sendo, os enterococos estão incluídos no grupo D, porém não deixam de ser estreptococos fecais. Sendo assim, todo enterococo é um estreptococo fecal, mas um estreptococo fecal pode não ser necessariamente um enterococo (BANWART, 1989).

Evidentemente, enterococos, estreptococos do grupo D e estreptococos fecais não são sinônimos.

O termo estreptococo fecal, apesar de ser muito vago, é usado em vários trabalhos para descrever diferentes espécies de estreptococos de origem fecal (FACKLAN, 1972).

2.2.2. Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos estreptococos fecais

2.2.2.1. *S. faecalis*

S. faecalis juntamente com suas duas sub-espécies (*zymogenes* e *liquefaciens*), também denominados de *Enterococcus faecalis*, produzem ácido a partir de frutose, galactose, glicose, glicerol e sacarose, não produzindo 1-arabinose.

São células ovais, a maioria formando pares ou pequenos cordões. Geralmente, não possuem motilidade. São aeróbios ou facultativamente anaeróbios. São catalase negativos. Toleram uma concentração de 6,5% de NaCl, possuem uma temperatura ótima de crescimento à 37°C. Crescem entre 10 e 45°C, e pH de 9,6. Toleram 40% de bile e são beta-hemolíticos, além de hidrolisarem a arginina, hipurato e esculina. Fermentam a glicose e reduzem o "litmus milk", coagulando-o. Podem digerir a caseína e a gelatina (HARDIE, 1984). Patterson & Jackson (1979), citados por LEITÃO (1985), constataram que os *S. faecalis* são resistentes a fatores ambientais. Podem sobreviver fora do trato intestinal em ambientes ácidos e alimentos congelados (BANWART, 1989). São, predominantemente habitantes do trato intestinal de humanos, mas podem ocorrer em animais.

PATTERSON, T.E. & JACKSON, H. Effect of storage at 1° and 4°C on viability and injury of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis*. J. Appl. Bacteriol., 46: 161-7, 1979.

2.2.2.2. *S. faecium*

S. faecium e sua variedade (*durans*), também denominados de *Enterococcus faecium*, são células esféricas ou ovoídes. Geralmente se apresentam em pares ou formando pequenos ou alongados cordões. Não possuem motilidade nem formam esporos. São catalase negativos (HARDIE, 1984). São predominantemente encontrados nas fezes de animais, tendo sido sugeridos como indicador de contaminação proveniente de animais domésticos sendo que esta espécie não é comum no trato intestinal do homem (DELAZARI, 1979). Em pesquisas, esses organismos foram isolados das fezes de boi, porco e homem (ICMSF, 1978). Crescem entre 10 e 45°C, toleram uma concentração de 6,5% de NaCl, crescem até pH 9,6 e toleram 40% de bile. Quanto à hemólise, podem apresentar alfa-hemólise. Hidrolisam arginina e esculina, mas não necessariamente o hipurato. Sobrevivem a 60°C por 30 min e não digerem a gelatina e nem a caseína.

2.2.2.3. *S. bovis*

São células esféricas ou ovoídes, formando pares ou cordões. Não possuem motilidade. São aeróbios. Geralmente não crescem em meio contendo 6,5% de NaCl pH acima de 9,6, embora tenham sido isolados "strains" capazes de crescer nestas condições. Possuem antígeno do Grupo D, pertencendo as

sim ao grupo D de Lancefield. Toleram 40% de saís de bile. A maioria dos "strains" são alfa-hemolíticos e não hidrolisam a arginina nem o hipurato, mas hidrolisam a esculina.

Não crescem em presença de 0,04% de telurito de potássio e em 0,1% de azul de metileno. Muitos "strains" sobrevivem ao aquecimento a 60°C por 30 min. A temperatura mínima de crescimento é de 22°C. São encontrados no trato intestinal de ruminantes mas podem ocorrer em fezes humanas (HARDIE, 1984) e de equinos (DELAZARI, 1979).

2.2.2.4. *S. equinus*

Os *S. bovis* e *S. equinus* possuem morfologia e propriedades fermentativas semelhantes.

Os *S. equinus* formam cordões moderadamente longos, são aeróbios e não possuem motilidade. Pertencem ao grupo D de Lancefield. Produzem ácido a partir de glicose, frutose, galactose, maltose e às vezes da sacarose. São alfa-hemolíticos. Não crescem a 10°C em pH 9,6, em concentrações de 6,5% de NaCl e 0,04% de telurito. Toleram 40% de bile. Não hidrolisam argina e hipurato porém hidrolisam a esculina. Não sobrevivem a 60°C por 30 min.

Tem como "habitat" o trato alimentar e intestinal dos equinos, podendo ocasionalmente serem encontrados no trato intestinal de humanos e suínos (DELAZARI, 1979).

2.2.2.5. *S. avium*

Os *S. avium*, também conhecidos por *Enterococcus avium*, estão classificados nos grupos Q e D por possuírem antígenos de ambos os grupos. São encontrados no trato intestinal de galinhas e também no de humanos e outros animais. O *S. avium* possui a maioria das características dos enterococos, com exceção a de não tolerar 0,1% de azul de metileno e não hidrolisar a esculina. A maioria dos "strains" são alfa-hemolíticos. São células ovoídes, encontrando-se em pares ou formando cordões. Crescem a 10 e 45°C em pH 9,6, porém, crescendo lentamente a uma concentração de 6,5% de NaCl. Também toleram 40% de sais de bile, não hidrolisam hipurato mas sim esculina (BANWART, 1989 e HARDIE, 1984).

2.2.2.6. *S. gallinarum*

S. gallinarum ou *Enterococcus gallinarum* é formado por células que se encontram em pares ou pequenos cordões. Não possuem motilidade, são catalase negativos, produzem colônias rosas em meio KF. Pertencem ao Grupo D e usualmente hidrolisam o hipurato. Crescem a 10 e a 45°C, toleram 6,5% de NaCl, pH de 9,6 e 40% de sais de bile. A maioria é alfa-hemolítico. Diferenciam do *S. avium* por reagirem somente com o antígeno do grupo D, além de todos produzirem ácido a partir do amido, enquanto que nem todos os *S. avium* produzem

(BANWART, 1989 e HARDIE, 1984).

2.2.2.7. *S. mitis*

Possuem antígenos do grupo O e N. São células esféricas, formando longos cordões. Produzem ácido a partir da glicose, maltose, sacarose e, às vezes, lactose. São alfa-hemolíticos, porém alguns "strains" não são hemolíticos. Podem ou não crescer a 45°C. São encontrados na saliva humana, podendo ocorrer também nas fezes (ICMSF, 1978).

2.2.2.8. *S. salivarius*

Possuem antígeno do grupo K. São células esféricas ou ovoídes, formando pequenos ou longos cordões. São aeróbios. A maioria dos "strains" não são hemolíticos, entretanto, alfa e beta hemólise podem ocorrer.

Formam ácido a partir da glicose, sacarose, maltose e, às vezes, da lactose. São piogênicos. A maioria hidrolisa esculina, mas não arginina e hipurato.

Eventualmente, podem crescer a 45°C, mas não a 10°C, nem a pH de 9,6. Não toleram 6,5% de NaCl. Podem ocorrer nas fezes humana (ICMSF, 1978).

2.2.2.9. *S. suis*

Ocorrem em cocos isolados, ou em pares ou formando pequenos cordões. Reagem com o antissoro D do grupo Lancefield. Produzem ácido a partir da lactose, glicose, frutose e maltose, não produzindo de sorbitol e manitol. Crescem vagarosamente em 40% de saís de bile. São alfa-hemolíticos em ágar sangue.

A maioria dos "strains" não hidrolisam o hipurato. Até pouco tempo, o microrganismo era considerado mais como uma variedade do *S. bovis* (HARTMAN & DIEBEL, 1984) do que um outro estreptococo do grupo D. Entretanto, "strains" de *S. suis* não se enquadram na taxonomia numérica do grupo D (HARDIE, 1984).

2.2.3. Habitat

Os estreptococos fecais são assim denominados por estarem presentes nas fezes de humanos e animais de sangue quente (DELAZARI, 1979). Em alguns casos, os níveis nas fezes humanas podem atingir de 10^3 a 10^4 células/g. Essas bactérias enterais estão amplamente distribuídas na natureza, sendo comumente encontradas sobre a pele, cabelo, pena de animal, mãos de trabalhadores, alimentos ou em equipamentos (BANWART, 1989).

Os *S. faecalis* tem sido sugeridos como índice de sanidade pelo fato de terem sido encontrados em vários tipos de produtos.

Estes microrganismos possuem uma resistência razoavelmente alta ao congelamento, tratamento térmico moderado e pH elevado. Devido a sua alta resistência, algumas vezes estes cocos não servem como índices de contaminação fecal por sobreviverem bem em condições adversas (ICMSF, 1978). Por outro lado, a sua presença pode indicar um processamento inadequado ou uma recontaminação pós-tratamento térmico apropriado (GALLO, 1990).

Por este motivo, a ocorrência de um enterococo ou de um estreptococo fecal em um alimento não confirma que bactérias patogênicas estejam presentes, pois as mesmas não sobrevivem bem nestas condições. Apesar disso, em alimentos desidratados é grande a capacidade e o período de sobrevivência das salmonelas, sendo que em valores de baixa atividade de água, abaixo de 0,20, as salmonelas permanecem viáveis por longos períodos, mesmo sob condições adversas de acidez e temperatura (GALLO, 1990).

Assim sendo, os enterococos podem estabelecer-se em uma usina de processamento como um contaminante comum, bem como a sua incorporação em alimentos não implica uma contaminação direta (DELAZARI, 1979).

Por outro lado, a presença de elevados números

de enterococos em alimentos indica uma qualidade microbiológica duvidosa, porque essa ocorrência implica numa exposição a condições favoráveis à multiplicação de organismos indesejáveis ou numa sanidade deficiente (DELAZARI, 1979).

Tendo em vista que os estreptococos do grupo D são sempre encontrados nas fezes humanas e de alguns animais, é impossível não admitir sua origem fecal. Não se pode negar que, algumas vezes, esses organismos podem ser encontrados em outros ambientes, mas esta é a dúvida para a persistência em demonstrar que não se pode invalidar sua credibilidade como indicador de contaminação fecal (ICMSF, 1978). Por várias dessas controvérsias, a ocorrência desses microrganismos na água ou em alimentos indica uma contaminação fecal direta ou indireta (BANWART, 1989).

A influência da temperatura no crescimento dos estreptococos fecais é variada, dependendo da espécie. Os alimentos mantidos em temperatura entre 10 e 45°C podem conter um grande número de enterococos, pois ao contrário de outros estreptococos, os enterococos são versáteis à temperatura limite de crescimento e à tolerância térmica (ICMSF, 1978).

BANWART (1989) observou que os *S. faecalis* sobrevivem também em alimentos congelados.

Os *S. faecium*, *S. equinus* e *S. suis* sobrevivem a pasteurização (60°C por 30 min), sendo assim chamados de

termodúricos (ICMSF, 1978).

HARDIE (1984) relatou que a temperatura mínima para o crescimento do *S. bovis* é de 22°C.

ICMSF (1978) verificaram que os *S. mitis* não crescem à temperatura de 45°C e HARDIE (1984) verificou que os *S. salivarius* podem eventualmente crescer a 45°C mas não a 10°C. HARDIE (1984), porém, verificou que os *S. salivarius* podem eventualmente crescer a 45°C mas não a 10°C, assim como os *S. equinus*, enquanto que os *S. gallinarium*, *S. avium* e *S. faecalis* crescem entre 10 e 45°C.

Em relação ao efeito do pH, parece ser 9,6 o pH que diferencia os enterococos dos estreptococos fecais, embora alguns "strains" de outros gêneros da família *Streptococaceae* tenham sido isolados crescendo a este pH (ICMSF, 1978).

Quando a atividade de água, muitas bactérias Gram positivas e negativas podem sobreviver a desidratação, principalmente se for usada matéria-prima de baixa qualidade (DELAZARI, 1979).

LEITÃO & DELAZARI (1974) isolaram enterococos de alimentos desidratados.

UZELAC & STILLE (1977), analisando produtos com

baixa atividade de água 0,53, 0,33 e 0,11 isolaram células de *S. faecalis* a uma atividade de água de 0,11.

No que diz respeito a conservantes e antibióticos na inibição de enterococos e estreptococos fecais, o crescimento a uma concentração de 6,5% de NaCl é comumente utilizado para diferenciar os enterococos de outros estreptococos fecais. No entanto, 80% dos "strains" do grupo B e uma pequena quantidade de outros grupos possuem essa propriedade (HARDIE, 1984).

Os enterococos são sensíveis a cloração, sendo destruídos em 15 segundos com 100 ppm de cloro a pH 5,8 (BANWART, 1989).

Em relação a antibióticos, os enterococos são bastante resistentes. Foi observado que os estreptococos fecais são altamente resistentes à estreptomicina (HARTMAN et alii, 1965).

Em relação às suas características bioquímicas, todos os estreptococos do grupo D são capazes de hidrolisar a esculina, fato esse que levou a utilização da esculina para diferenciar os estreptococos do grupo D de outros estreptococos, de forma melhor que a resistência ao calor (FACKLAM & MOOD, 1970). Meyer and Schionfeld (1926) incorporaram sais de

MEYER, K. and SCHIONFELD, H. Ueber die Unterscheidung des Enterococcus vom Streptococcus viridans und die Beziehungen bei der zum Streptococcus latis zentralbe. Bakteriologische Parasitenkunde. Infectionsh. Hg. Abt. Orig. 99: 402-416.

bile a esculina e verificaram que todos os estreptococos do grupo D. cresciam com hidrólise de esculina, enquanto outros estreptococos não.

Swan (1954) usou um meio contendo 40% de saís de bile e verificou que há uma relação entre a habilidade de crescimento e a sorologia do grupo D (FACKLAM & MOOD, 1970).

Quanto à capacidade de hidrolisar o hipurato, somente os *S. faecalis* possuem sempre essa propriedade, sendo que ocasionalmente o *S. faecium* e *S. gallinarum* também o fazem, mas nunca o *S. avium*. Somente os *S. faecalis* e o *S. faecium* são tolerantes ao azul de metileno. Os enterococos, usualmente, não reduzem o nitrato e/ou não hidrolisam triglicerídeos, embora lipases tenham sido detectadas em alguns "strains" (HARDIE, 1984).

BANWART (1989), verificou que os enterococos podem sofrer injurias causadas por diversos fatores, entre eles os efeitos do calor, pH, atividade de água, sanitizantes, composição do substrato ou então uma combinação entre eles.

As células injuriadas de enterococos podem perder sua habilidade de crescimento na presença de certos agentes seletivos, como por exemplo azida de sódio (FACKLAM, 1972).

Em uma pesquisa realizada, onde 1173 cepas foram identificadas como estreptococos, formou-se 32 grupos quan

SWAN, A. 1954. The use of bile-esculin medium and Maxted's technique of lancefield grouping in the identification of enterococci (Group D streptococci). J. Clin. Pathol. 7: 160-163.

do caracterizado crescimento entre 10 e 45°C em concentração de 6,5% de NaCl e pH 9,6 e produção de amônia de arginina.

Os "strains" isolados foram classificados. As várias espécies obtidas indicaram que nenhum dos que cresceram no KF ou bile esculina foram seguramente selecionados como *S. faecalis* (MUNDT, 1976).

Kenner et alii (1961), apud por FACKLAM (1970) descreveu que no KF *Streptococcus* agar, meio utilizado para evidencição de contaminação fecal contendo azida como inibidor, maltose e lactose como fonte de carboidratos e indicador, mostrou que todos os estreptococos do grupo D e outros estreptococos cresciam dando reação ácida.

Foi constatado que a azida de sódio no meio KF, inibe o crescimento de células injuriadas, pois as mesmas tornam-se temporariamente susceptíveis aos componentes seletivos do meio.

2.2.4. Ocorrência de estreptococos fecais em alimentos

BANWART (1989) menciona que a ocorrência desses organismos pode ser significativa ou até mesmo insignificativa, dependendo do tipo de alimento.

Relativamente, baixos níveis, como 10^1 e 10^3 organismos/g, são encontrados em uma grande variedade de alimentos.

KENNER et alii. 1961. Fecal streptococci. I. Cultivation and enumeration of streptococci in surface waters. Appl. Microbiol. 9: 15-20.

O *S. faecium* e/ou *S. faecalis*, em certas variedades de queijo, pode ocorrer a uma frequência de 10^6 organismos por grama (HARTMAN & DIEBEL, 1984).

Foram identificados vários gêneros de bactérias aeróbias em produtos desidratados, dentre eles os *Streptococcus*. Os estreptococos fecais contaminam uma indústria de processamento de alimentos, podendo se estabelecer e se multiplicar sobre as superfícies contaminadas, fato pelo qual esses organismos tem habilidade de se multiplicar em ambientes distantes de sua fonte de contaminação fecal, tendo sido adotados como indicadores de uma limpeza deficiente. Os enterococos não podem ser comparados com a *E. coli* como índice de poluição. A simples presença de estreptococos fecais não evidencia uma contaminação fecal. As contagens totais, coliformes e de coliformes fecais, são necessárias em conjunção com a contagem de estreptococos (BANWART, 1989).

É difícil estabelecer um nível de enterococos nos alimentos porque normalmente suas contagens variam, dentre outros fatores, com o tipo de alimento, temperatura de estocagem, tempo e aquecimento (ICMSF, 1978).

2.2.5. Patologia, ocorrência e epidemiologia dos es treptococos fecais

Os ênterococos são ocasionalmente associados com diarreia, entretanto não são considerados patogênicos (ICMSF, 1978).

O uso de estreptococos fecais como determinan
tes do histórico sanitário de alimentos, sua associação com doenças nascida do alimento e suas ocorrências em condições patológicas humanas atestam sua importância em saúde pública.

Muitos autores tem atribuído aos enterococos ca
sos e surtos de "toxinfecções" em alimentos muito contamina
dos.

É estabelecido que os estreptococos do grupo D de Lancefield causam diarreia ao homem (BANWART, 1989).

STEHLT et alii (1989) e ICMSF (1978) afirmam que, em geral, eles não são considerados patogênicos mas, apropriada
mente, podem ser chamados de oportunistas. Por esta razão, são encontrados associados a numerosos casos de infecção de baixo grau.

A evidência de que eles podem também causar gas
treenterites é apenas circunstancial. Entretanto, não há dúvi
das de que o crescimento de estreptococos do grupo D em ali
mentos pode levar a formação de quadros clínicos significan

tes (STEHLI et alii, 1989).

No soro de pacientes afetados por infecção/intoxicação alimentar foram encontrados títulos elevados de anticorpos, frente a linhagem de enterococos isolados de suas fezes. Outros autores relatam que os enterococos isolados de pessoas doentes pertencem a sorotipos diferentes das cepas isoladas de indivíduos sadios sendo diferentes também dos alimentos, que quando ingeridos, não produziram a doença (ICMSF, 1978).

Segundo HARTMAN et alii (1965), a primeira implicação dos estreptococos fecais como causadores de envenenamento alimentar ocorreu em 1924, na cidade de Nova York, envolvendo aproximadamente 82 pessoas. Aconteceu em uma escola, atingindo tanto alunos como professores que ingeriram leite. Os sintomas começaram a se manifestar 2 horas após a ingestão do leite e consistiram em dores abdominais, náuseas com vômito, diarréia e fraqueza. O leite consumido neste dia provinha de outra fonte, onde foi caracterizada a presença de estreptococo não hemolítico.

Posteriormente, outra epidemia foi relatada por Guthot, em 1957, que isolou uma quantidade razoável de estreptococos de fezes de pessoas que apresentavam uma certa patologia, formada de gêneros de estreptococos proteolíticos.

Um outro surto de intoxicação foi relatado por Aoki e Sakai, em 1926, sendo a causa de um envenenamento alimentar. Esse fato ocorrido em uma tecelagem, foi devido à evidência de sintomas em vários trabalhadores, após uma refeição. Foram realizadas análises dos alimentos servidos e constatou-se que estreptococos de origem fecal foram isolados em grande quantidade em pedaços de peixes cozidos. Os outros alimentos analisados encontravam-se praticamente estéreis.

O envenenamento alimentar por estreptococos fecais é um paradoxo. Alguns autores confirmaram um quadro de gastrenterite no homem similar às produzidas pelo *Clostridium perfringens*, enquanto outros autores, mais recentemente, indicaram que esses organismos ingeridos por voluntários humanos não provocaram qualquer tipo de alteração. Porém, não são citados quais os fatores em que o isolamento destas culturas foi feito, como temperatura, pH e tempo de estocagem de alimentos.

Devido a grande quantidade de controvérsias, não se pode garantir que os enterococos sejam causadores de toxinfecções alimentares. Frequentemente, se encontra enterococos em grande quantidade nos alimentos que, após ingeridos, não produzem nenhuma toxinfecção (ICMSF, 1978).

Ainda os autores não tem conseguido produzir a doença de modo experimental no homem. Por isso, não se reconhece a capacidade dos enterococos de produzir toxinfecções alimentares, uma vez que não se sabe quais espécies ou sorotipi

pos podem ser responsáveis por toxinfecções. Também não foi possível demonstrar a existência de toxina produzida, nem é conhecido o mecanismo pelo qual os enterococos poderiam levar a toxinfecções alimentares. Alguns autores até mencionam a necessidade de alguma associação sinérgica com outro microorganismo para produção da doença. (GALLO, 1990).

2.3. Coliformes

2.3.1. Introdução

O grupo dos coliformes inclui todas as bactérias aeróbias facultativas em forma de bastonetes, gram negativas, não formadoras de esporos e que fermentam a lactose com produção de gás em 24/48 horas a 35-37°C.

Esses organismos são encontrados abundantemente nas fezes de animais, inclusive na do homem, mas também são encontrados em "habitat" não fecal, como o solo e plantas, daí a diferenciação entre coliformes totais e fecais. Os coliformes totais podem perdurar em solos e superfícies por muito mais tempo que a *E. coli*.

Os coliformes não indicam uma contaminação fecal no sentido de implicar em contato imediato com fezes ou contaminação fecal de superfícies. Além disso, os resultados da determinação quantitativa de coliformes (NMP) em alimen

tos, incluindo a *E. coli*, podem não ter relação com a extensão da contaminação original, onde ocorreram abusos em relação ao tempo e temperatura.

Em alimentos processados, os coliformes indicam processamento inadequado ou uma contaminação pós processamento, mais provavelmente através de operários, instrumentos, sujos, equipamentos, superfícies ou ainda, da matéria-prima antes do processamento, que pode ter sido contaminada por contato humano, solo, esterco ou água poluída de origem fecal.

A *E. coli* é geralmente o indicador preferido de contaminação fecal recente, ou pelo substrato no qual ocorreu a proliferação da bactéria e patógenos associados, se presentes, ou ainda por uma contaminação direta do alimento com a matéria fecal. Na verificação da qualidade do alimento, a presença da *E. coli* usualmente assegura a mais positiva suposição de riscos do que a presença de outros coliformes.

2.3.2. Histórico

A *E. coli* foi originalmente identificada por Escherich em 1885, segundo GUERREIRO et alii (1984).

Houve tempo em que a detecção de espécies patogênicas da família *Enterobacteriaceae*, especialmente *Salmonella* e *Shigella*, era uma tarefa muito difícil, porém a única pos

sível para um exame das condições higiênicas da água e alimentos (BUTTIAUX & MOSSEL, 1961).

A idéia subjacente era que outra bactéria dessa família fosse utilizada, porém de fácil identificação. Foi difícil a escolha de um microrganismo indicador, tendo o mesmo sido usado desde 1982 (BANWART, 1989), quando Shardingger utilizou a *E. coli* pela primeira vez para este fim (GUERREIRO, 1984).

Desde então, várias pesquisas foram realizadas para isolar este organismo da água e dos alimentos. Sua presença indica que possa ter havido contaminação fecal e que a *Salmonella* e outros patógenos possam estar presentes.

Como o resultado do uso dessas bactérias foi bem sucedido, as mesmas foram empregadas como possíveis indicadores de contaminação fecal (BANWART, 1989).

2.3.3. Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica da *E. coli*

A *E. coli* pertence a família *Enterobacteriaceae* e primariamente é representante do grupo dos coliformes fecais. A bactéria se apresenta em forma de pequenos bastonetes Gram negativos, aeróbia e facultativamente anaeróbia. Pode não possuir motilidade ou pode possuí-la através de flagelos peritríquios. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C e o pH

em torno de 7,0 (BRENNER, 1984).

Algumas bactérias mucóides podem produzir cápsulas. Não formam esporos e são destruídas em 1 min a 100°C, ou em 30 min a 60°C (GUERREIRO, 1984).

Em relação às suas características bioquímicas, a *E. coli* é capaz de fermentar a D-glicose com produção de ácido e gás. Uma característica importante é que a maioria das cepas a fermentam. A produção de ácido a partir da lactose é um fator importante, o qual a distingue de outros gêneros desta família predominantemente de origem fecal. Porém alguns "strains" fermentam lentamente este açúcar e alguns outros poucos "strains" não o fermentam. Por este motivo, outras provas bioquímicas e sorológicas devem ser usadas para sua correta identificação.

Não utilizam citrato, são Voges-Proskauer negativas, produzem indol, são vermelho de metila positivas (BRENNER, 1984) e não produzem H₂S (gás sulfídrico).

Em meios seletivos, como o meio Mac-Conkey, formam colônias vermelhas, enquanto que no meio Eosina Azul de Metileno (EMB) formam colônias verdes com brilho metálico em 24 horas de incubação a 35-37°C.

Os coliformes fecais são destruídos por pasteurização ou temperaturas normais de cozimento. Quanto a sua resistência ao congelamento, depende do grupo e do substrato

Splittstoesser et alii (1982) inocularam 4 tipos de vegetais que foram mantidos a -10°C por 200 dias. A sobrevivência dos coliformes fecais variou de 0,014 a 75%, a *E. coli* 0,0014%, e quando reinoculada sobreviveu num nível de 7,7% (BANWART, 1989).

Quanto a sobrevivência em alimentos desidratados, a ocorrência de coliformes requer confirmação dos tipos, contudo, em se tratando de vegetais os mesmos, são comumente encontrados. Se a presença da *E. coli* é confirmada, significa contaminação fecal humana através de manuseio durante o processamento, contaminação animal através das práticas de campo ou ainda um controle ineficiente na usina de processamento (DELAZARI, 1979). Entretanto, o processo de desidratação pode provocar sobre as Enterobacteriaceas, lesões que prejudicam a fisiologia de suas células, as quais não se proliferam em meio seletivo habitualmente usado contendo inibidores em concentrações bem toleradas por células não prejudicadas da mesma espécie ou sorotipo (MOSSEL & RATTO, 1970).

SPLITTSTOESSER et alii, 1982. Survival of fecal coliforms in frozen vegetable homogenates. J. Food Prot. 45: 1041-1043.

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de coliformes (incluindo a *E. coli*) em alimentos podem não ter nenhuma relação com o grau de contaminação original, pois pode ter ocorrido injúria das células (ICMSF, 1978).

Esse fenômeno têm sido observado em bastonetes gram negativos, entre eles a *E. coli*. Dentre as causas desse fenômeno, um efeito marcante ocorre na membrana externa, a qual serve de barreira à penetração de substâncias variadas. Também constatou-se a ocorrência da injúria em 99% de uma população de *E. coli* após 60 min a uma exposição em uma solução 0,3M de tampão acetato, em pH de 4,2.

Verificou-se que a neutralização direta no meio ácido não permitia a reparação das células, sendo, na verdade, letal à população microbiana.

Tais lesões sub-letais podem provir de uma baixa atividade de água. Para isso, células estressadas devem ser submetidas a um tratamento de reativação.

2.3.4. Habitat

A *E. coli* tem como habitat natural o trato entérico do homem e de outros animais de sangue quente (ICMSF, 1978). O grupo coliforme é restrito aos organismos que crescem nessas condições.

Com os procedimentos da "U.S. Food and Drug Administration" (FDA), 1978, a definição de um coliforme presuntivo é um organismo capaz de produzir gás em Caldo Lauryl Sulfate Triptose (CLST), em 24-48 horas, à $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Um coliforme confirmado é aquele capaz de produzir gás em Caldo Verde Brilhante Lactose e Bile 2% (BGLB), em 24-m 48 horas, à $35-37^{\circ}\text{C}$ (BANWART, 1989).

Os coliformes estão muito difundidos e podem ser detectados em vários tipos de alimentos, mas não indicando necessariamente uma contaminação de origem fecal no sentido de envolver contato direto ou indireto com fezes (ICMSF, 1978).

O grupo coliforme inclui, além da *E. coli*, outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e outras poucas espécies de outros gêneros. Entretanto, nem todas as bactérias desse grupo são de origem fecal. Alguns coliformes podem ser encontrados no solo sendo suas células disseminadas na atmosfera através da poeira, por isso os coliformes são encontrados em todos os tipos de vegetais. Kaferstein (1977) apud BANWART (1989), analisou 30 amostras de alface e todas continham coliformes.

Foi observado por Eykman, em 1904 (BANWART, 1989), que os coliformes fecais compreendem os organismos capazes de

KAFERSTEIN, F.K. 1977. The occurrence of antibiotic resistant microorga nisms (*Escherichia coli* type I and coliforms) in some foods. Zbl. Bac t. Hyg. I. Abc. Orig. B164: 111-118.

fermentar a lactose e serem selecionados por incubação a temperaturas mais elevadas, em torno de 44-45°C (ICMSF, 1978).

Os coliformes fecais consistem, primariamente a *E. coli*, sendo entretanto observado que alguns "strains" de *Klebsiella* e *Enterobacter* podem produzir gás a temperatura de 44,5°C. Paralelamente a temperatura elevada, o teste IMViC pode ser utilizado para diferenciar a *E. coli* de outras espécies (BANWART, 1989).

2.3.5. Ocorrência de coliformes em alimentos

As condições higiênico-sanitárias da produção de alimentos são geralmente precárias e, portanto, é comum observar a presença de coliformes, inclusive a *E. coli* (FRANCO et alii, 1985).

Foi constatado que um animal excreta cerca de 130 milhões a 18 bilhões de células de *E. coli* por dia. Consequentemente, há uma associação entre a *E. coli* material fecal e possivelmente patógenos entéricos (BANWART, 1989).

Em alimentos processados, a presença de coliformes indica um processamento inadequado ou contaminação pós-processamento, provavelmente oriunda da manipulação de trabalhadores, instrumentos ou maquinaria sujos.

A *E. coli* em alimentos é geralmente o indicador

dor preferido de contaminação fecal, recente ou de um substrato no qual a proliferação da *E. coli* e outros patógenos associados, se presentes, podem ocorrer (ICMSF, 1978).

O tipo de alimento influencia a taxa de sobrevivência da *E. coli* (BANWART, 1989).

Em muitos produtos alimentícios, a sobrevivência da *E. coli* pode ser similar a de outros patógenos, mas pode ocorrer que os mesmos sobrevivam após a destruição da *E. coli*.

Por outro lado, a presença da *E. coli* não significa que patógenos entéricos também estejam presentes (BANWART, 1989).

Foi observado por RICHTER & SHEDDY (1990) que algumas companhias especializaram-se em distribuir carne crua, moída e congelada, usada especialmente na alimentação de animais de zoológicos e cães. Essa carne não passa por nenhum tipo de inspeção e é usualmente descongelada à temperatura ambiente antes de ser oferecida aos animais.

Ficou constatada a presença de patógenos nessas carnes, provocando casos de gastroenterite em animais, além das mesmas poderem levar a depleção dos sistemas imunológicos, o que faz com que esses animais estejam mais susceptíveis às doenças. O nível de bactérias coliformes excede 10^4 /g. É elevada a probabilidade que a *E. coli* enteropatogênica esteja

presente, uma vez que esses organismos podem ser provenientes da mesma origem que a *E. coli* não patogênica.

ANDERSON & BAIRD-PARKER (1975), utilizaram em suas pesquisas um método desenvolvido por Delaney et alii, (1962), para contagem direta de *E. coli* em alimentos, uma vez que seus resultados variavam de acordo com substrato, meio de cultivo e temperatura de incubação utilizados. Esse método explora a habilidade da *E. coli* em produzir indol, crescendo a 44°C sobre uma membrana de acetato de celulose colocada sobre um meio de bile, em placa de Petri. Esse método é de rápida aplicação e se aplica a direta enumeração da *E. coli* em alimentos.

Muitos laboratórios de alimentos utilizam testes para a estimativa de gêneros da família *Enterobacteriaceae* lactose positivos e negativos. Esses testes são usados por diversas razões, dentre as quais poderíamos citar que as bactérias coliformes constituem um grupo taxonomicamente mal definido. Assim, a contagem de coliformes pode incluir variedades de diferentes bactérias, dependendo da espécie, meio, temperatura de incubação e critério de leitura dos resultados. Essas variantes podem resultar em discrepantes dados obtidos em diferentes laboratórios (ICMSF, 1978).

BAXTER & HILZAPFEL (1982), em pesquisa realizada com alguns alimentos, observaram um número significativo tanto de *Enterobacteriaceae* lactose positiva como negativa, em contraste aos relatórios apresentados por Julseth &

Diebel, 1974, Powers et alii (1975), onde números relativamente baixos de *Enterobacteriaceae* são mencionados.

Muitas bactérias gram negativas foram isoladas, incluindo *Salmonella* spp. O gênero *Enterobacter* foi detectado em maior número. A *E. coli* também foi isolada, indicando uma possível contaminação fecal (BAXTER & HOLZAPFEL, 1982).

Somente o teste lactose positiva ou negativa pode levar a falsos resultados, onde organismos lactose negativos são predominantes, como aconteceu com uma amostra de queijo contaminado por "strains" de *E. coli*, que fermentam lentamente a lactose. A contagem, assim, não excedeu aos padrões de aceitabilidade, entretanto a contagem de *Enterobacteriaceae* obteve valores no qual o produto seria rejeitado (ICMSF, 1978).

Em observação a *E. coli* enteropatogênica em alimentos, de um total de 380 "strains" de *E. coli* isolados apenas 5% eram enteropatogênicos (CANTONI et alii, 1976).

2.3.6. Patologia, ocorrência e epidemiologia dos *coli* formes

Durante muito tempo, a *E. coli* primariamente

JULSETH, R.M. & DIEBEL, R.H. 1974. Microbial profile of selected species and herbs at import. J. Milk Food Technol. 37(8): 414.

POWERS, E.M. et alii, 1975. Incidence and levels of *Bacillus cereus* in processed spices. J. Milk Food Technol., 39(10): 668.

foi considerada como uma oportunista, uma simples residente do trato intestinal de homens e animais, porém sem ação patogênica (ICMSF, 1978).

Além da gravidade da constatação de que um alimento está contaminado com microrganismos de origem fecal, a presença da *E. coli* pode ter um significado particularmente importante, uma vez que se caracterizaram linhagens enteropatógenicas causadoras de vários surtos de gastroenterites provocadas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminado (FRANCO et alii, 1985).

Cepas envolvidas em processos patogênicos são morfológica e bioquimicamente indistinguíveis das não patogênicas. Nem todas as linhagens de *E. coli* obedecem a definição do grupo coliforme, isto é, são capazes de fermentar a lactose, ou a fazem lentamente (MEHLMAN, 1984).

Alguns "strains" de *E. coli* produzem enterotoxinas. Duas enterotoxinas têm sido bastante estudadas, distinguindo-se a toxina termolábil (LT) e outra termoestável (ST) (FRANCO et alii, 1985). Ambas são encontradas isoladas ou juntamente com "strains" de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC).

As enterotoxinas termolábeis (LT) se caracterizam por serem uma proteína imunogênica, perdendo sua atividade a 65°C/15 min, enquanto que as termoestáveis (ST) são peptídeos, não imunogênicas e suportam 100°C/15 min. (GALLO, 1990).

Em relação ao mecanismo de patogenicidade, as linhagens produtoras de enterotoxinas (LT e ST) causam a eliminação excessiva de água e eletrólitos no intestino delgado. As linhagens enteroinvasivas infectam e penetram nas células epiteliais do cólon, produzindo lesões e sintomas de disenteria bacilar. Os biotipos responsáveis pela diarreia em crianças normalmente não são produtoras de enterotoxina, nem invasivos, aparentando serem linhagens capazes de produzir colites hemorrágicas, que provocam esses sintomas pelo efeito de uma citotoxina (MEHLMAN, 1984).

Cepas de *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) produzem um processo infeccioso onde a patogenicidade é evidenciada pela invasão de células da mucosa intestinal sem produção de toxinas. As cepas de *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC) causam diarreia, principalmente em crianças com menos de um ano de idade, onde vários sorotipos são reconhecidos pela presença de antígeno somático, capsular ou flagelar (MEHLMAN, 1984).

O estudo da estrutura imunológica da *E. coli* demonstra a existência dos seguintes antígenos: O (somático), H (flagelar) e K (capsular). O antígeno O não é inativado pelo calor por 2 horas. O antígeno H, das amostras móveis, desenvolve mais facilmente em meios semi-sólidos para o teste de motilidade, como por exemplo no meio Ewing, sendo pouco ativo em ágar sólido, que é mais utilizado para o antígeno K.

Os soros produzidos em coelhos formam antígenos da *E. coli*, que permitem a identificação de sorotipos de importância por suas diferenças imunológicas (GUERREIRO, 1984).

Essas subdivisões das linhagens de *E. coli* são baseadas nos diferentes antígenos encontrados na estrutura superficial das bactérias (BRENNER, 1984).

Em relação a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), vários trabalhos têm demonstrado o envolvimento dessas cepas com surtos de gastroenterites, provocados pela ingestão de alimentos contaminados.

Além disso, ETEC têm sido envolvida como o principal agente etiológico causador da chamada "diarréia dos viajantes", síndrome que afeta indivíduos que se locomovem de países desenvolvidos para outros com saneamento básico deficiente (FRANCO et alii, 1985).

A patogenicidade da *E. coli* enterotoxigênica é medida através das fimbrias (fator de colonização) e porcentagem de toxina. As fimbrias desempenham um importante papel para a patogenia, pois permitem a aderência das células bacterianas às células epiteliais. Em ensaios realizados, ficou demonstrado que, retirando-se as fimbrias e administrando via oral uma suspensão da mesma, não houve reprodução da doença, sendo as bactérias ingeridas eliminadas nas fezes (GALLO, 1990).

MAGALHÃES & CARVALHO (1981), em pesquisa reali

zada, observou que 67% das crianças diarreicas possuíam *E. coli* enteropatogênica e/ou invasivas em suas fezes, enquanto que 12% das crianças apresentavam infecções provenientes de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). Entre os grupos, apenas um produziu LT e quatro ST, a infecção por *E. coli* invasiva não foi observada.

A diarreia aguda têm sido causadora de morte infantil no terceiro mundo. Consequentemente, o estabelecimento de etiologia em diarreia é muito desejável, se medidas de controle forem tomadas (GERHARDT, 1984).

Paradoxalmente, pouco se sabe a respeito da frequência com que estes patógenos podem ser encontrados nos alimentos e, portanto, se desconhece qual o seu papel na disseminação dessas bactérias (FRANCO et alii, 1985).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram analisadas amostras de macarrão, biscoito doce e salgado, leite aromatizado, sopa desidratada, chocolate em pó e gelatina, que são especialmente produzidos e destinados a merenda escolar, sendo distribuídos às crianças das escolas do primeiro grau do município de Piracicaba. Estes alimentos são adquiridos pela Prefeitura, permanecendo estocados e distribuídos à medida em que são requisitados pelas escolas.

3.2. Métodos

3.2.1. Amostragem

Quinzenalmente, durante um período de quatro meses, foram coletadas de quatro a cinco subamostras de cada um dos sete tipos de alimentos, as quais eram retiradas aleatoriamente do lote. A quantidade total de cada produto analisado existente no dia de amostragem foi denominada de lote.

As subamostras coletadas de cada produto foram levadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial para realização das análises.

Os produtos coletados estavam acondicionados nas seguintes embalagens: **biscoitos doce e salgado**, em caixas de papelão com 6,0 kg do produto, subdivididos em 30 pacotes de 200 g, empacotados separadamente em papel celofane; **leite aromatizado**, em caixas de papelão com 10 kg do produto, subdivididos em sacos plásticos com peso variando de 1,0 kg a 2,0 kg; **chocolate em pó**, em caixas de papelão com 10 kg do produto subdivididos em sacos plásticos com peso variando de 0,5 kg a 1,0 kg; **sopa desidratada**, em caixas de papelão com 12 kg do produto subdivididos em sacos plásticos com 2 kg; **gelatina**, em caixas de papelão com 10 kg do produto subdivididos em sacos plásticos de 1,0 kg; **macarrão**, em caixas de papelão com 10 kg do produto, subdivididos em sacos plásticos de 0,5 kg.

3.2.2. Preparo da amostra

Das quatro subamostras de cada produto, foram retiradas e pesadas assepticamente, de pontos variados, pequenas porções até que se formasse uma amostra média de 25 g que era imediatamente homogeneizada em 225 ml de solução salina peptonada, utilizando-se pêrolas de vidro ou mixer, quando necessário, obtendo-se a primeira diluição (10^{-1}). Da primeira diluição foram pipetados 10 ml e homogeneizados com

90 ml de solução salina peptonada, obtendo-se dessa forma a segunda diluição e assim sucessivamente até a quinta diluição, seguindo-se a metodologia de BUSTA et alii (1984) e ICMSF (1978).

3.2.3. Contagem presuntiva de enterococos

Das diluições realizadas (item 3.2.2.) tomar um mililitro e inocular em meio KF *Streptococcus* Agar (KENNER FECAL STREPTOCOCCAL) pela técnica "pour plate" em duplicatas. Incubar as placas a 35-37°C durante 48 horas, de acordo com a metodologia proposta por ICMSF (1978).

Após incubação, contar as colônias caracterizadas por apresentarem coloração vermelha (*S. faecalis*) e coloração rosa (*S. faecium*).

3.2.4. Confirmação de enterococos

Seguindo a metodologia proposta pelo ICMSF (1978) e MacFADIN (1984), selecionar 5 a 10 colônias típicas (item 3.2.3.), incubar em tubos de ensaio contendo 5 ml de Brain Heart Infusion (caldo BHI) e incubar a 35-37°C por 24 horas.

Após este período, para cada um dos tubos que apresentar turbidez transferir, com auxílio de uma alça, ma

terial para outros tubos, que contém:

- 5 ml de caldo BHI a uma concentração de 6,5% de NaCl. Incubar a 35-37°C por 48 horas e observar crescimento;

- 5 ml de caldo BHI. Incubar a 44-46°C por 48 horas e observar crescimento;

- 5 ml de bile Esculina Agar e incubar a 35°C, por 48 horas e observar o crescimento e mudança de coloração do meio para preto amarronzado (hidrólise da esculina).

A seguir, nos tubos que apresentarem crescimento nas condições acima, inocular as culturas em tubos contendo meio nutriente agar (NA) inclinado. Incubar a 30°C por 24 horas. Manter as culturas em óleo mineral para posterior realização dos testes bioquímicos e confirmação do organismo como sendo um enterococo. Reativar mensalmente as culturas mantidas em óleo mineral em caldo BHI e incubar a 37°C por 24 horas e novamente inocular em meio nutriente agar. Incubar a 30°C por 24 horas mantendo as culturas em óleo mineral. Realizar, conjuntamente com a inoculação em nutriente agar, a coloração de Gram e o teste da Catalase.

3.2.5. Testes bioquímicos realizados para caracterização de estreptococos fecais

3.2.5.1. Teste da catalase

Nos tubos inoculados do item 3.2.4., onde houve crescimento microbiano, pipetar 1 ml de peróxido de hidrogênio 3%, observar a formação de efervescência. Segundo HARTMAN & DIEBIL (1984), essa reação não deve ocorrer pois os estreptococos são catalase negativos.

3.2.5.2. Hidrólise da arginina

Inocular as colônias isoladas em NA (3.2.4.) em meio arginina líquido. Também inocular as colônias em meio líquido não contendo arginina (tubo controle). Incubar por 2 a 3 dias a 35-37°C. Após incubação, as culturas devem ser testadas em um "spot plate" utilizando a solução de Nessler. O resultado positivo é caracterizado pelo aparecimento de uma coloração amarela ou laranja, quando comparada ao controle, GERHARDT (1984).

3.2.5.3. Hidrólise do hipurato

Preparar uma solução de hipurato de sódio 1% em água destilada e distribuir 0,4 ml da solução em tubos de 2 ml. Estocar os tubos a -20°C até o momento do uso.

Inocular as culturas isoladas do NA (3.2.4.) em BHI agar e incubar a 37°C por 24 horas. Após incubação, retirar uma porção das culturas crescidas na superfície do BHI e formar com a solução de hipurato (previamente descongelada) uma suspensão bem concentrada. Incubar os tubos em banho maria a 35-37°C por 2 horas e adicionar 0,2 ml de reagente Ninhidrina, sem agitar. Continuar a incubação a 37°C por mais 10 minutos. A reação positiva é verificada pelo aparecimento de uma coloração roxa intensa, devido a glicina que é formada da hidrólise do hipurato, segundo GERHARDT (1984).

3.2.5.4. Hidrólise da esculina

Inocular as culturas isoladas do NA (3.2.4.) em meio contendo 0,01% de esculina e 0,05% de citrato férico. Incubar os tubos por 24 horas a 37°C. O resultado positivo se dá pelo aparecimento de uma coloração preto amarronzada, devido à hidrólise da esculina, GERHARDT (1984).

3.2.5.5. Hemólise

Inocular as culturas isoladas do NA (3.2.4.) em placas com o meio Columbia Agar contendo 5% de sangue de carneiro estéril e disfibrinado. Incubar a 37°C por 24-48 horas.

As colônias beta-hemolíticas se caracterizam por formar um halo incolor ao seu redor (eritrócitos das

células completamente lisadas). As colônias alfa-hemolíticas caracterizam-se por formar uma zona indistinta devido à parcial destruição dos eritrócitos, frequentemente acompanhada por uma descoloração para o verde amarronzado no meio, GERHARDT (1980).

3.2.6. Teste morfológico

- Coloração de Gram

Realizar de acordo com MAC FADIN (1980).

3.2.7. Determinação do número mais provável de enterococos por grama de alimento

Transferir porções de 1 mililitro das diluições previamente preparadas (3.2.2.) para 5 tubos de meio líquido SF (*Streptococcus faecalis* broth). Incubar os tubos a 35°C por 48 horas.

Todos os organismos são inibidos pela azida contida no meio, exceto os estreptococos do Grupo D, que fermentam a glicose, resultando numa reação ácida com mudança de coloração do meio, de roxo para amarelo. Os tubos com mudança de coloração são considerados positivos. Selecionar a maior diluição na qual os 5 tubos mudaram de coloração e as duas diluições subsequentes. Anotar o número de tubos que

mudaram de coloração e consultar a Tabela 1. Determinar o número mais provável de enterococos/g de alimento.

De cada um dos tubos com meio SF positivos, retirar material com uma alça e inocular em tubos contendo caldo BHI a 35°C por 24 horas. Observar crescimento. Nos tubos que apresentarem turbidez, realizar as análises dos itens 3.2.4., 3.2.5., 3.2.6. MAC FADIN (1984) e ICMSF (1978).

3.2.8. Determinação do número mais provável de coliformes por grama de alimento

3.2.8.1. Teste presuntivo para coliformes

Inocular 1 ml de cada diluição (item 3.2.2.) para uma série de 3 tubos de ensaio com caldo Lauryl Sulfate Tryptose Broth (CLST), contendo tubos de Durham invertidos. Homogeneizar e incubar a 35-37°C por 24-48 horas. Após 24 horas, verificar se há presença de gás dentro dos tubos de Durham, ocupando aproximadamente 10% destes. Caso contrário, retornar os tubos à estufa por mais 24 horas.

Completado o período de incubação, selecionar a diluição mais alta, na qual os três tubos apresentaram resultado positivo, e as outras duas diluições subsequentes, ICMSF (1978).

Tabela 1. Determinação do número mais provável e 95% de limite de confiança para várias combinações de resultados positivos quando utilizados 3 ou 5 tubos por diluição. (0,1 g, 0,01 g e 0,001 g).

Combination of Positives	Tubes per Dilution					
	3			5		
	MPN Index per gram	95% Confidence Limits Lower	95% Confidence Limits Upper	MPN Index per gram	95% Confidence Limits Lower	95% Confidence Limits Upper
0-0-0	<3			2		
0-0-1	3	<0.5	9	2	<0.5	7
0-1-0	3	<0.5	13	2	<0.5	7
0-2-0	—			4	<0.5	11
1-0-0	4	<0.5	20	2	<0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0.5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	12	3	28
2-3-0	—			—		
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380	—		
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	—		
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	—		
3-3-0	240	36	1,300	—		
3-3-1	460	71	2,400	—		
3-3-2	1,100	150	4,800	—		
3-3-3	>2,400	—	—	—		
4-0-0	—			13	3	31
4-0-1	—			17	5	46
4-1-0	—			17	5	46
4-1-1	—			21	7	63
4-1-2	—			26	9	78

* Taken from Association of Official Analytical Chemists 1970, Bacteriological Analytical Manual 5th edition AOAC Washington, D.C.

Fonte: OBLINGER, J.L. & KOBURGER, J.A. The most probable number technique. In: SPECK, M.L. ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2 ed. Washington, American Public Health Association, 1984. cap. 6. p. 99-111.

3.2.8.2. Teste confirmativo para coliformes

Transferir, com o auxílio de uma alça, material dos tubos de CLST que apresentarem resultados positivos para tubos com meio Brilhante Green Bile Broth 2%, contendo tubos de Durham invertidos, incubar por 24-48 horas e observar a formação de gás.

A formação de gás confirma a presença de organismos do grupo coliformes segundo, ICMSF (1978).

Para se obter o NMP de coliformes por grama de alimento realizar a leitura e consultar a Tabela 1.

3.2.9. Determinação de coliformes de origem fecal

Transferir, com o auxílio de uma alça material dos tubos positivos do meio CLST para tubos contendo meio E.C. Broth com tubos de Durham invertidos. Incubar a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em banho-maria com agitação por 24-48 horas, observando o aparecimento de bolhas dentro do tubo de fermentação. Nos tubos positivos suspeita-se que os coliformes sejam de origem fecal. Realizar a leitura como no item 3.2.8.2., consultando a Tabela 1, e determinar o número mais provável de coliformes fecais/g de alimento, segundo ICMSF (1978).

3.2.10. Teste confirmativo para *E. coli*

Retirar, com auxílio de uma alça, material de cada um dos tubos positivos do meio E.C e inocular em placas com EMB agar (Eosin Methylene-Blue Agar) em duplicatas. Incubar a 35-37°C por 24 horas. Observar o crescimento das colônias típicas, ou seja, aqueles que apresentam brilho metálico, podendo ou não ter núcleo preto.

Selecionar colônias típicas individuais e inocular em meio lactose, incubando 35-37°C por 24 horas. Realizar o Gram e confirmar a presença de bactérias Gram negativas não formadoras de esporos. Caso as colônias examinadas sejam características, inocular as mesmas em meio nutriente agar e incubar a 35-37°C por 24 horas, segundo ICMSF (1978).

Após o período de incubação, realizar os testes bioquímicos para confirmação das colônias.

3.2.11. Testes bioquímicos realizados para a caracterização da *E. coli*

3.2.11.1. Produção de Indol

Transferir as culturas suspeitas para tubos contendo caldo triptofano. Incubar a 30°C por 2 a 7 dias.

Adicionar 0,5 ml do reagente de Kovac, agitando vagarosamente. O resultado positivo se dá pelo apareci

mento de uma cor vermelha na camada superior do tubo de ensaio. (MAC FADIN, 1980).

3.2.11.2. Teste do Vermelho de Metila

Inocular as colônias suspeitas em caldo glicose-fosfato (MRVP) e incubar a 30°C por 2 a 7 dias. Após o período de incubação, adicionar 1 gota da solução de vermelho de metila por ml de caldo de cultura.

O aparecimento da cor vermelha indica resultado positivo, segundo metodologia proposta por MAC FADIN (1980).

3.2.11.3. Teste de Voges-Proskauer

Inocular as colônias suspeitas em caldo glicose-fosfato e incubar a 30°C por 24/48 horas. Após o período de incubação, adicionar 0,5 ml de uma solução de alfa-naftol e 0,5 ml de uma solução de hidróxido de potássio a 40%. Agitar vigorosamente. O resultado positivo se dá pelo aparecimento de uma coloração vermelha dentro de 20 min.. (MAC FADIN, 1980).

3.2.11.4. Utilização de Citrato

Inocular as colônias suspeitas em tubos inclinados de meio Agar Citrato de Simmon. Incubar a 30°C, por

24/48 horas. A reação positiva se dá pela mudança da colora
ção do meio, de verde para azul. (MAC FADIN, 1980).

3.2.12. Contagem total de microrganismos aeróbios

Das diluições realizadas (item 3.2.2.), tomar
1 ml e inocular em meio Plate Count Agar (PCA), pela técni
ca "pour plate".

Incubar a $35-37^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas. Após incu
bação, realizar a contagem das colônias e expressar o resul
tado em UFC/g alimento (MAC FADIN, 1980).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da contaminação dos alimentos analisados por estreptococos fecais revelou índices de contaminação de 23,2% referente ao *S. faecium*, e de 8,9% *S. faecalis*.

Em relação à incidência de coliformes, foram isolados 8,9% de coliformes fecais e 14,2% de coliformes totais, sendo que nenhuma cepa de *E. coli* foi isolada.

No que diz respeito à contagem total, alguns alimentos apresentaram índices elevados, não significando necessariamente que os mesmos estejam impróprios para consumo. Por outro lado, as contagens mais elevadas geralmente ocorreram nos alimentos onde coliformes e estreptococos foram isolados.

Os resultados das 56 amostras analisadas encontram-se nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Tabela 2. Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em biscoito doce.

1ª análise 2ª análise 3ª análise 4ª análise 5ª análise 6ª análise 7ª análise 8ª análise										
CLST	(-)	(-)	$2^{10^{-1}} 2^{10^{-2}} 10^{-3}$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
SF broth	(-)	(-)	(-)	(-)	8 ent/g	$\geq 2400 \text{ ent/g}$	$\geq 2400 \text{ ent/g}$	(-)	(-)	(-)
C.TOTAL(PCA)	100 ufc/g	2400 ufc/g	2000 ufc/g	7000 ufc/g	430000 ufc/g	310000 ufc/g	40000 ufc/g	400 ufc/g		
KF	(-)	(-)	(-)	270000 ufc/g	150000 ufc/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BGBL	(-)	(-)	21 c.tot/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
EC	(-)	(-)	21 c.fec/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BHI - 24 hs	(-)	(-)	(-)	(-)	Turbidez	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)
BHI - 45°C	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
BHI+NaCl 45°C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
OXIGALL 35°C	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
CATALASE	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
GRAM	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
HID. ESCULINA	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
HIPURATO	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
ARGININA	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
HEMOLISE	(-)	(-)	(-)	(-)	β -hemolít.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Dentre as amostras de biscoito doce analisadas, cujos dados estão dispostos na Tabela 2, pode-se observar que, de um modo geral, o grau de contaminação fecal foi baixo, porém tendo sido significativa a contagem de estreptococos fecais, acima dos padrões previstos por lei que contém um máximo de 5 x 10 enterococos /g.

A contagem total variou de 100 a 430.000 UFC, parecendo a mesma ser relativamente alta.

Em observação à Tabela 3, as análises de leite aromatizado não apresentaram ocorrência de coliformes totais e fecais; entretanto foram isolados estreptococos alfa-hemolíticos.

Em relação a contagem total, a mesma não apresentou índices tão elevados, variando de 100 a 5.800 UFC, estando praticamente dentro dos padrões de acordo com o Decreto.

Os dados apresentados na Yabela 4 indicaram que as amostras de biscoito salgado apresentaram um baixo índice de contaminação fecal, inerente à contagem de coliformes, em hora tenha sido significativa a contagem de enterococos apresentado resultados bem acima dos padrões permitidos por lei.

Quanto à contagem total os resultados variam de 10 a 30.000 UFC/g parecendo o mesmo também ser relativamente alto.

Tabela 3. Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em leite aromatizado.

1ª análise 2ª análise 3ª análise 4ª análise 5ª análise 6ª análise 7ª análise 8ª análise										
CLST	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
SF broth	180 ent/g	220 ent/g	46 ent/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	63 ent/g
C.TOTAL(PCA)	5800 ufc/g	450 ufc/g	1200 ufc/g	620 ufc/g	200 ufc/g	(-)	(-)	100 ufc/g	1000 ufc/g	
KF	5700 ufc/g	10 ufc/g	90 ufc/g	660 ufc/g	(-)	(-)	(-)	(-)	900 ufc/g	
BGBL	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
EC	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
BHI - 24 hs	Turbidez	Turbidez	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Turbidez	
BHI - 48°C	Turbidez	Turbidez	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Turbidez	
BHI+NaCl 35°C	Turbidez	Turbidez	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Turbidez	
OXIGALL 35°C	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	
CATALASE	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
GRAM	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	
HID. ESCULINA	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	
HIPURATO	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	
ARGININA	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	
HEMÓLISE		α-hemolít.	α-hemolít.						α-hemolít.	

Tabela 4. Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em biscoito salgado.

1ª análise 2ª análise 3ª análise 4ª análise 5ª análise 6ª análise 7ª análise 8ª análise										
CLST	(-)	(-)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
SF broth	11 ent/g	(-)	(-)	(-)	23 ent/g	(-)	(-)	8 ent/g	31 ent/g	(-)
C.TOTAL(PCA)	2700 ufc/g	10 ufc/g	30000 ufc/g	7000 ufc/g	3000 ufc/g	3000 ufc/g	3000 ufc/g	3000 ufc/g	5000 ufc/g	
KF	20000 ufc/g	(-)	(-)	210 ufc/g	(-)	(-)	(-)	150 ufc/g	(-)	
BGBL	(-)	(-)	43 c.tot/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
EC	(-)	(-)	43 c.fec/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
BHI - 24 hs	(-)	(-)	(-)	Turbidez	(-)	(-)	(-)	Turbidez	(-)	
BHI - 45°C	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
BHI+NaCl 35°C	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
OXIGALL 35°C	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
CATALASE	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
GRAM	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
HID. ESCULINA	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
HIPURATO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
ARGININA	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
HEMÓLISE				α-hemolít.				não-hemol.		

As análises de sopa apresentaram um elevado índice de contaminação fecal, no que diz respeito às contagens de coliformes e estreptococos, resultados estes semelhantes aos obtidos por LEITÃO et alii (1974). Entretanto, nenhuma cepa de *E. coli* foi isolada, embora tenham sido identificados estreptococos alfa e beta hemolíticos.

Os altos índices de contaminação apresentados nestas análises podem ser parcialmente explicados, pois estes alimentos apresentam uma grande quantidade de aditivos e ervas, conforme constatado por LEITÃO et alii (1974).

Entretanto, os resultados encontrados nesta a nálise diferem dos obtidos por FANELLI et alii (1970), uma vez que nos dados relatados em seu experimento consta apenas a utilização de coliformes como índice de qualidade, concluindo-se que as sopas analisadas foram preparadas sob condições de excelente qualidade; conclusão essa que parece um pouco precipitada, pois os autores não utilizaram também enterococos como índices.

A contagem total foi elevada, evidenciando uma correlação entre uma alta contagem e a presença de organismos indicadores.

Os resultados encontrados nas análises de sopa se encontram bem acima dos padrões estabelecidos pelas normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (Decreto).

Tabela 5. Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e conta gem total em sopa desidratada.

1ª análise 2ª análise 3ª análise 4ª análise 5ª análise 6ª análise 7ª análise 8ª análise										
CLST	10^{-1} 2	10^{-2} 0	10^{-3} 0	(-)	10^{-1} 3	10^{-2} 0	10^{-3} 0	10^{-1} 3	10^{-2} 0	10^{-3} 0
SF Broth	33 ent/g			(-)	79 ent/g	17 ent/g	49 ent/g	130 ent/g		(-)
C.TOTAL(PCA)	28000 ufc/g	630 ufc/g	8000 ufc/g	(-)	8000 ufc/g	12000 ufc/g	300000 ufc/g	24000 ufc/g	5600000 ^{ufc} /g	3500 ufc/g
KF	900 ufc/g		80000 ufc/g	(-)	80000 ufc/g	(-)	23000 ufc/g	260000 ufc/g	300 ufc/g	(-)
BGBL	9 c.tot/g	(-)	23 c.tot/g	(-)	23 c.tot/g	4 c.tot/g	15 c.tot/g	23 c.tot/g	(-)	(-)
EC	(-)		23 c.fec/g	(-)	23 c.fec/g	(-)	15 c.fec/g	(-)	(-)	(-)
BHI - 24 hs	Turbidez	(-)	Turbidez	(-)	Turbidez	Turbidez	Turbidez	Turbidez	(-)	(-)
BHI - 45°C	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
BHI+NaCl 35°C	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
OXIGALL 35°C	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
CATALASE	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
GRAM	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
HID.ESCOLINA	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
HIPURATO	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
ARGININA	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
HEMÓLISE	β -hemolít.	(-)	α -hemolít.	β -hemolít.	β -hemolít.	β -hemolít.	β -hemolít.	não-hemol.		

Pela análise da Tabela 6, pode-se observar que as amostras de chocolate em pó não apresentaram contaminações por coliformes totais e fecais. Porém, foram isolados estreptococos alfa e beta hemolíticos, acima dos padrões permitidos.

A contagem total apresentou-se relativamente baixa, variando de 40 UFC/g a 6.000 UFC/g praticamente dentro dos padrões estabelecidos.

As amostras de gelatina utilizadas nessa análise não apresentaram nenhum tipo de contaminação fecal.

A contagem total foi muito baixa, mostrando ser esse um produto de excelente qualidade.

Pela análise da Tabela 8, verificou-se que nas amostras de macarrão apresentaram uma baixa ocorrência de coliformes, abaixo dos padrões permitidos. Por outro lado, observou-se uma contagem significativa de enterococos, onde foram isolados estreptococos alfa e beta hemolíticos.

A alta incidência dos enterococos talvez possa ser parcialmente explicada, segundo HARTMAN et alii (1965), que afirmaram que a contaminação pode ocorrer pela adição de ovos desidratados contaminados à massa, durante o preparo do macarrão.

Tabela 6. Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em chocolate em pó.

1ª análise 2ª análise 3ª análise 4ª análise 5ª análise 6ª análise 7ª análise 8ª análise										
LCST	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
SF broth	170 ent/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C.TOTAL(PCA)	2200 ufc/g	2230 ufc/g	6000 ufc/g	40 ufc/g	(-)	(-)	(-)	350 ufc/g	400 ufc/g	
KF	70 ufc/g	(-)	5000 ufc/g	(-)	(-)	(-)	(-)	31000 ufc/g	(-)	
BGBL	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
EC	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
BHI - 24 hs	Turbidez	(-)	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
BHI - 45°C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
BHI+NaCl 35°C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
OXIGALL 35°C	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
CATALASE	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
GRAM	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
HID. ESCULINA	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
HIPURATO	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
ARGININA	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
HEMÓLISE	α-hemolít.		α-hemolít.							

Tabela 7. Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em gelatina.

1ª análise 2ª análise 3ª análise 4ª análise 5ª análise 6ª análise 7ª análise 8ª análise										
CLST	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
SF broth	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C. TOTAL (PCA)	40 ufc/g	20 ufc/g	70 ufc/g	10 ufc/g	10 ufc/g	10 ufc/g	50 ufc/g	20 ufc/g		
KF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BGBL	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
EC	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BHI - 24 hs	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BHI - 45°C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BHI+NaCl 35°C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
OXIGALL 35°C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CATALASE	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
GRAM	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
HID. ESCULINA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
HIPURATO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ARGININA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
HEMÓLISE										

Tabela 8. Ocorrência de estreptococos fecais, coliformes, coliformes fecais e contagem total em macarrão.

1ª análise 2ª análise 3ª análise 4ª análise 5ª análise 6ª análise 7ª análise 8ª análise													
CLST	(-)	(-)	-	10^{-1} 2	10^{-2} 0	10^{-3} 0	10^{-1} 3	10^{-2} 0	10^{-3} 0	10^{-1} 3	10^{-2} 2	10^{-3} 2	(-)
SF broth	140 ent/g	33 ent/g	330 ent/g	230 ent/g	230 ent/g	230 ent/g	230 ent/g	230 ent/g	230 ent/g	49 ent/g	240 ent/g	240 ent/g	240 ent/g
C. TOTAL (PCA)	140000 ufc/g	8700 ufc/g	160000 ufc/g	9200 ufc/g	7000 ufc/g	890000 ufc/g	3000 ufc/g	60000 ufc/g	1500 ufc/g	3000 ufc/g	60000 ufc/g	60000 ufc/g	60000 ufc/g
KF	2000 ufc/g	500 ufc/g	5000 ufc/g	16000 ufc/g	1300 ufc/g	150000 ufc/g	3000 ufc/g	1500 ufc/g	1500 ufc/g	3000 ufc/g	1500 ufc/g	1500 ufc/g	1500 ufc/g
BGBL	(-)	(-)	(-)	(-)	9 c. tot/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
EC	(-)	(-)	(-)	(-)	9 c. fec/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BHI - 24 hs	Turbidez	(-)	Turbidez	Turbidez	Turbidez	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
BHI - 45°C	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
BHI+NaCl 35°C	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
OXIGALL 35°C	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
CATALASE	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
GRAM	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
HID. ESCULINA	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
HIPURATO	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
ARGININA	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
HEMÓLISE	α-hemolít.	(-)	α-hemolít.	α-hemolít.	β-hemolít.	β-hemolít.	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	não-hemolít.

De acordo com os resultados obtidos e, apesar de alguns pesquisadores considerarem os estreptococos como índices e/ou indicadores de contaminação fecal, não se pode afirmar a ocorrência de patógenos. Sugere-se, entretanto, que as condições de higiene e saneamento no processamento de alguns dos alimentos analisados sejam melhoradas.

O fator de contaminação possivelmente deve estar na negligência no preparo da merenda ou na utilização de água imprópria para consumo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem que sejam alcançadas algumas conclusões:

- Os índices de contaminação fecal nos alimentos analisados foram relativamente baixos, tanto no que se refere aos coliformes como estreptococos;

- Em todas as amostras analisadas observaram-se resultados mais significativos no isolamento de enterococos fecais, que no isolamento de coliformes;

- Considerando-se que 8,9% das amostras analisadas estavam contaminadas com *S. faecalis* e 23,2% com *S. faecium*, e sendo ambos enterococos, pode-se admitir que os mesmos comportaram-se como melhores indicadores e/ou índices que os coliformes fecais, onde se alcançou 8,9% de contaminação nas amostras;

- Pode-se admitir, que os enterococos fecais são melhores indicadores que os coliformes quando os alimentos em estudo possuírem baixos teores de umidade.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDERSON, J.M. & BAIRD-PARKER, A.C. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype 1 in food. *Journal Applied Bacteriology*, Reading, 39: 111-7, jun. 1975.
- BANWART, J.G. Indicator organisms. In: BANWART, J.G. *Basic food microbiology*. 2 ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1989. cap. 2. p.11-48.
- BANWART, J.G. Indicator organisms. In: BANWART, J.G. *Basic food microbiology*. 2.ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1989. cap. 7. p.371-92.
- BAXTER, R. & HOLZAPFEL, W.H. A microbial investigation of selected spices, herbs and additives in South Africa. *Journal of Food Science*, Champaign, 47: 571-4, 1982.
- BRENNER, J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: *Bergey's manual of sistematic bacteriology*. 2 ed. Baltimore, Willians & Wilkins, 1984. v.1. p.408-23.
- BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; ADAMS, D.M.; JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: SPECK, M.L. ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2 ed. Washington, American Public. Health Association, 1984. cap. 4. p.62-83.

- BUTTIAUX, R. & MOSSEL, D.A.A. The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water. *Journal Applied Bacteriology*, Reading, 24(3): 353-64, Jul. 1961.
- CABRAL, A.C.D. & ALVIM, D.D. Alimentos desidratados - conceitos básicos para sua embalagem e conservação. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 18(1): 1-65, jan./mar. 1981.
- DELAZARI, I. Aspectos microbiológicos de alimentos desidratados. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 16(3): 227-60, jul./set. 1979.
- DONALD, C.A., Jr. Setting microbiological limits in the food industry. *Food Technology*, Champaign, 28(10): 34-41, Oct. 1974.
- EIROA, V.M.N. Atividade de água: influência sobre o desenvolvimento de microrganismos e métodos de determinação em alimentos. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 18(3): 353-83, jul./set. 1981.
- FACKLAM, R.R. & MOOD, M.D. Presumptive identification of group D estreptococci: the bile esculin test. *Applied Microbiology*, Washington, 20(2): 245-50, Aug. 1970.
- FACKLAM, R.R. Recognition of group D streptococal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Applied Microbiology*, Washington, 23(16): 1131-9, un. 1972.

- FANELLI, H.J.; PETERSON, A.C.; GUNDERSON, M.F. Microbiology of dehydrated soups. *Food Technology*, Champaign, 19: 83-93, 1970.
- FRANCO, B.D.G.M.; GUTH, B.E.C.; TRABULSE, L.R. Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de alimentos. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 16(1): 51-5, jan./mar. 1985.
- GALLO, C.R. et alii. *Microbiologia de Alimentos*. Piracicaba, LCT/ESALQ, 1990. 1v.
- GERHARDT, P., ed. *Manual of methods for general bacteriology*, 3 ed. Washington, American Society for Microbiology, 1984. p.411-23.
- GUERREIRO, H.G. *Escherichia*. In: GUERREIRO, H.G. et alii. *Bacteriologia Especial com interesse em saúde animal e pública*. Porto Alegre, Ed. Sulina, 1984. cap. 15, p.178-83.
- HARDIE, J.M. *Streptococcus*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 12 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.2. p.1043-71.
- HARREWIJN, G.A.; MOSSEL, D.A.A. Microbiology of dried foods. *Revista de Microbiologia*. São Paulo, 2: 601-13. Apud *Microbiologia Abstracts*, London, 24(10): 27, Oct. 1989. (Resumo).

HARTMAN, P.A.; REIBOLD, G.W.; SARASWAT, D.S. Indicator orga
nisms - A review. The role of enterococci in food poisoning.
Journal Paper. n° J-5142. Iowa, American Public Health
Association, Jun., 1965.

HARTMAN, P.A. & DIEBEL, R.H. The Enterococci. In: SPECK, M.
L. ed. *Compendium of methods for the microbiological exami*
nation of foods. 2 ed. Washington, American Public Health
Association, 1984. cap. 32, p.405-9.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS
FOR FOODS. *Micro-organisms in foods*; their significance
and methods of enumeration. 2 ed. Toronto, University
of Toronto Press/ICMSF, 1978. v.1. p.3-43.

ICMSF Members. Preparation and dilution of the food homoge
nate. Their significance and methods of enumeration. 2
ed. 1978. v.1. p.106-39.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS
FOR FOODS. *Micro-organisms in foods*; Their significance
and methods of enumeration. 2 ed. Toronto, University
of Toronto/ICMSF, 1978. v.1. p.148-56.

KIBBET, H.J.; HAGEDORN, C.; McCOY, E.L. Use of fecal Strep
tococci as indicators of pollution in soil. *Applied Envi*
ronmental Microbiology, Washington, 35(4): 711-7, Abr.
1978.

- LEITÃO, M.F. A injúria microbiana e sua importância na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 22(4): 397-416, out./dez. 1985.
- LEITÃO, M.F.; DELAZARI, I.; MAZZONI, H. Microbiologia de alimentos desidratados. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 5: 233-41, 1973/74.
- MAC FADIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980. v.1., p.4-213.
- MAC FADIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980. v.2., p.287-447.
- MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M.; CARVALHO, A.E. Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 12(2): 38-41, abr./jun. 1981.
- MARTINS, M.T. Evaluation of the fecal coliformes/fecal streptococci ratio in the characterization of fecal pollution in a subtropical river. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 15(2): 9-102, abr./jun. 1984.
- MEHLMAM, I.J. Coliforms, fecal coliforms, *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli*. In: SPECK, M.L. ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2.ed. Washington, American Public Health Association, 1984. cap. 25. p.265-85.

- MOSSEL, D.A.A.; HARREWIJN, G.A.; NESSELROOY-VAN ZADELHOFF, C.F.M. Standardization of the selective inhibitory effect of surface active compounds used in media for the detection of *Enterobacteriaceae* in foods and water. *Health Lab. Sci. Netherlands*. 11(4): 260-67. Apud *Microbiological Abstracts*, London, 24(10): 148, Oct. 1989. (Resumo).
- MOSSEL, D.A.A. & SHENNAN, J.L. Microorganisms in dried foods: their significance, limitation and enumeration. *Journal of Food Technology*, Oxford, 11: 205-20, 1976.
- MOSSEL, D.A.A. & RATTO, M.A. Rapid detection of sublethally impaired cells of *Enterobacteriaceae* in dried foods. *Applied Microbiology*, Washington, (2): 273-5, Aug. 1970.
- MUNDT, J.O. Streptococci in dried and frozen foods. *Journal of Milk Food Technology*, Knoxville, 39(6): 413-6, Jun. 1976.
- OBLINGER, J.L. Recovery of streptococci from a variety of foods. *J. Milk Food Technol.* Gainesville, 38(6): 323-26. 1975.
- OBLINGER, J.L. & KOBURGER, J.A. The most probable number technique. In: SPECK, M.L. ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2 ed. Washington, American Public Health Association, 1984. cap. 6. p.9-111.

RICHTER, E.R. & SHEDDY, AL.I. Microbiological quality and safety of Zoo food. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 56(4): 877-80, Abr. 1990.

SALEH, B.A.; SILVERMAN, G.J.; GOLDBLITH, S.A. Microbiol evaluation of commercial frieze-dried foods. *Food Technology*, Champaign, 20(5): 103-6, May. 1966.

SÃO PAULO. Leis, Decretos, etc. Decreto nº 12.342 de 27 de setembro de 1978. *Imprensa Oficial do Estado S/A*, São Paulo, Regulamento da Promoção, Preservação e Recuperação da Saúde no Campo de Competência da Secretaria de Estado da Saúde.

SHARF, J.M. Indices de sanidade. In: _____. *Métodos recomendados para exame microbiológico de alimentos*. São Paulo, Polígono, 1972. p.173-85.

STEHLI, D.; OSWALD-KUHLMANN, D.; BACHMANN, M.R.; ESCHER, F. Dehydratation of vegetables with natural air convection. *Technol. Food Sci. Technol.*, Zurich, 21(5): 303-6. 1988.

TAKACS, J. & KOVACS, S. Comparative studies on optimal conditions for enterococcus demonstration. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* Hungary, 24(4): 413-19. 1974. Apud *Microbiology Abstracts*, London, 24(10): 14, Oct. 1989. (Resumo)

TROLLER, J.A. Food spoilage by microorganisms tolerating low
-aw environmental. *Food Technology*, Champaign, 33(1):
72-5, Jan. 1979.

TROHER, J.A.; BERNARD, D.T.; SCOTT, V.N. Measurement of wa
ter activity. In: SPECK, M.L. ed. *Compendium of methods
for the microbiological examination of foods*. 2 ed. Was
hington, American Public Health Association, 1984. cap.8
p.124-34.

UZELAC, G. & GRONEVER, K.J. The survival of bacteria of fae
cal origin in dry products as a function of water activi
ty. *Abt. Microbiol. Bonn*, 73(8): 235-39. 1977. Apud
Microbiology Abstracts, London, 24(10): 23, Oct. 1989.
(Resumo)

UZELAC, G. & STILLE, B. Survival ability of faecal origin
in dry products as a function of water activity. Part 2.
Studies with *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis*.
Abt. Microbiol. Bonn, 73(10): 325-29. 1977. Apud *Micro
biology Abstracts*, London, 24(10): 16, Oct. 1989. (Resu
mo).

WEBB, S.J. The effects of oxigen on the possible repair of
dehydration damage by *Escherichia coli*. *Journal General
Microbiology*, London, 58: 317-26, Jul. 1969.