

DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO E TECNOLOGIA DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL

Diretor: Prof. Dr. Omar J. M. Barbuto

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE GERMES DOS GRUPOS COLIFORME E ENTEROCOCO NO LEITE E EM ALGUNS DE SEUS DERIVADOS *

(INCIDENCE OF COLIFORM AND ENTEROCOCCI MICROORGANISMS
IN MILK DAIRY PRODUCTS)

JOSÉ CEZAR PANETTA
Instrutor

INTRODUÇÃO

Tão somente ao se publicarem trabalhos acêrca de microrganismos que fermentavam a lactose (PARASTIRIU; PRESCOTT; WINSLOW & WALKER; FROMME; ROGERS; CLARK & EVANS, citados por ALLEN & FABIAN (1)), cresceu o interesse sôbre a utilização da *Escherichia coli* como um germe teste para se constatar a qualidade sanitária da água e dos alimentos manipulados. Embora a *E. coli* fôsse mais facilmente isolada, comparativamente aos outros germes entéricos, a ocorrência de formas intermediárias e de espécies atípicas, além de sua patente semelhança com outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Arizona*, *Achromobacter*, etc.), fizeram com que se abandonasse parcialmente a pesquisa exclusiva desse microrganismo como indicador de poluição fecal. Estabeleceu-se, então, um grupo representativo que inclui êsse germe como protótipo, ao qual foi dada uma multiplicidade de designações (*B. coli*, *E. coli*, "côlon", *coli-aerogenes*, *Eschericia-Aerobacter*) e que BREED & NORTON (6) denominaram de coliforme.

Desde então, êsses microrganismos foram considerados como aptos a revelar a poluição fecal da água, do leite e também de outros alimentos. Na realidade, a maior parte dos Regulamentos de Inspeção Sanitária, ao preconizar normas para se aquilatar o grau de contaminação dos alimentos, sugere a pesquisa do número de coliformes nêles existentes (3, 5, 14, 35).

* Apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo e aprovado para a obtenção do título de Mestre. A análise estatística dos resultados deveu-se à cooperação do Departamento de Higiene, Saúde Pública e Bioestatística, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Entretanto, como resultado de mais de meio século de estudos, o significado do grupo coliforme como teste sanitário, tem sido bastante modificado. O advento de novos meios de cultura e de técnicas mais acuradas, demonstraram que esses fermentadores de lactose constituíam um grupo evidentemente heterogêneo, que compreendia muitos germes de "habitat" não exclusivamente intestinal e de duvidoso significado sanitário. Efetivamente, ROGERS, CLARK & EVANS (citados por ALLEN & FABIAN (1)) afirmaram que bactérias idênticas às do tipo "cólon", apareciam freqüentemente em frutas, cereais, gramíneas e no próprio solo, fato que comprometia seriamente a eficiência do grupo na indicação de poluição fecal, pois, embora os germes nêles classificados mantivessem a propriedade geral de fermentar a lactose com produção de gás, era possível dividi-los em subgrupos cujos representantes podiam ter como "habitat" o intestino do homem e dos animais ou, também, o solo, os cereais, os frutos e as gramíneas. Para complicar ainda mais o quadro, constatou-se que algumas bactérias esporogênicas e leveduras, abundantemente encontradas na natureza, também possuíam a capacidade de fermentar a lactose e produzir gás.

Mais tarde, o estabelecimento de meios de cultura diferenciais entre os germes que compõem o grupo coliforme, veio trazer menor risco à utilização desses microrganismos. Assim, *Escherichia coli* algumas vezes e coliformes de modo geral, passaram a ser usados para a comprovação da qualidade sanitária dos alimentos, tendo-se em vista, entre outros fatores, a predominância desses germes nas fezes humanas e os métodos relativamente simples para a sua evidência nos produtos elaborados.

Ainda que o significado dos estreptococos fecais como organismos indicadores de poluição, não tenha sido estabelecido para a água e outros alimentos com a mesma definibilidade que marca o conhecimento do grupo coliforme, eles têm sido isolados tão freqüentemente de fontes poluídas por fezes e das próprias fezes que parece razoável encarar a sua presença como indicadora de poluição fecal, uma vez que são raramente detectados em alimentos normais. Originalmente assinalada por LAWS & ANDREWS (cit. ALLEN & FABIAN (1)), sua importância não foi salientada senão quando HOUSTON (cit. ALLEN & FABIAN (1)) chamou especial atenção sobre o fato de que estreptococos e estafilococos pareciam ser característicos de esgotos e dejetos animais. Os próprios LAWS & ANDREWS acreditaram que eram mais verdadeiramente indicativos de poluição perigosa, uma vez que eram rapidamente demonstrados em águas recentemente poluídas.

Mas, ainda que um teste coli-aerogenes positivo represente indicação segura de contaminação fecal em potencial, um resultado negativo não prova ausência de contaminação, pois tem sido de-

monstrado repetidas vezes que bactérias coli-aerogenes são relativamente sensíveis às condições desfavoráveis do meio, podendo morrer antes dos micróbios enteropatogênicos (KELLY & ARCISZ (18)), além de que a *E. coli* pode, às vezes, ocorrer nas fezes em número extremamente pequeno (BORNEFF, cit. MOSSEL, VAN DIEPEN & BRUIN (25)).

Estes, entre outros, são fatores que levaram à procura de diferentes indicadores de poluição fecal, dentre os quais os estreptococos fecais, os quais parecem realmente úteis como microrganismos testes da qualidade bacteriológica dos alimentos, tendo em vista, principalmente, a sua resistência nos produtos (ALLEN & FABIAN (1, 2); BROWN & GIBBONS (7); BURTON (9); LARKIN, LITSKY & FULLER (20, 21); RAJ & LISTON (29); SOLOWEY & WATSON (34); WILSON & McCLESKLY (37), entre outros), em face do que os alimentos elaborados que se apresentem livres de estreptococos fecais estão, com grande probabilidade, livres também de patogênicos entéricos; além disso, a ausência de germes enterococos reflete boas condições higiênico-sanitárias do estabelecimento produtor.

A par de todas essas considerações, entretanto, deve-se assinalar que o número de bactérias fecais nos alimentos, sofre determinadas limitações na dependência do produto considerado. Realmente, as manibras tecnológicas inerentes à industrialização, fazem oscilar grandemente os teores em coliformes e enterococos. É o que verificaram ALLEN & FABIAN (1, 2), ao comparar os números de *E. coli* e *Str. faecalis* que ocorriam em alimentos de tecnologia diversa, particularmente com valores diferentes de pH. Da mesma forma, LARKIN, LITSKY & FULLER (21) estudaram 80 amostras de pescado congelado, comparando os resultados com os dois grupos de germes e concluindo que há sempre maior número de enterococos do que de coliformes; SOLOWEY & WATSON (34) pesquisaram a flora bacteriana de ovos em pó com alto teor de umidade, constatando a presença de enterococos e ausência de coliformes; acham esses autores que os enterococos, em condições propícias, multiplicam-se no ovo em pó, mas mesmo assim consideram que devido à falta de correlação entre a presença de *E. coli*, dos coliformes, das salmonelas e contagem global de bactérias, deve-se dar mais atenção aos enterococos como indicadores de poluição fecal ou como indicadores de falta de medidas higiênicas durante a produção. KELLY & ARCISZ (18) encetaram estudo para testar a sobrevivência de germes entéricos em ostras e mariscos, concluindo que a *E. coli* aumenta sobremodo em número após estocagem prolongada, o que é séria desvantagem para um germe tido como indicador de poluição, pois, não seria capaz de indicar as condições iniciais de contaminação; MORRIS & WEAVER (24) pesquisaram uma série de amostras de água de poços usadas para a indústria alimentar, com a finalidade de avaliar a eficiência de coliformes e enterococos no julgamento do grau de poluição.

Foram concordes ao afirmar que o número de coliformes e enterococos era, em média, idêntico na constatação de poluição de água recentemente coletada; em amostras de águas estocadas por 24 horas, os enterococos apresentaram-se superiores aos coliformes para a finalidade proposta.

WILSON & MCCLESKLY (37) estudaram a incidência de enterococos, *E. coli* e coliformes em ostras, correlacionando o número desses germes. Argumentam que sendo a *E. coli* tida durante muito tempo como o melhor indicador de poluição fecal, pode-se admitir que qualquer germe que habite o intestino e cujo número seja correlato ao dela, pode, idênticamente, ser usado como indicador de poluição. Na verdade, esses autores concluem que as ostras que apresentam elevado teor em coliformes, contém também elevado teor em *E. coli* e enterococos, sendo verdadeiro também o achado inverso. Esse fato justificaria, na opinião dos autores citados, o emprêgo de enterococos como indicadores de poluição.

Vantagens da utilização do índice de estreptococos fecais para laranja concentrada congelada foram assinaladas por HAHN & APPELMANN (15), ao passo que NIVEN JR. (26), citando vários autores, aponta as virtudes desse índice para frutas e verduras congeladas, tortas de carne congeladas, tortas congeladas de galinha e refeições pré-cozidas e congeladas.

Um outro aspecto que deve ser considerado ao tratar-se da pesquisa de bactérias fecais, diz respeito a que elas e, muito particularmente, os enterococos, podem ser incriminados como responsáveis por algumas toxinfecções alimentares (BUTTIAUX (10, 11); NIVEN JR. (26); SILLIKER & DEIBEL (33)). Num trabalho sobre o assunto, BUCHBINDER, OSLER & STEPHEN (8), apresentam evidências sobre a implicação desses germes como possíveis microrganismos responsáveis por quatro epidemias de toxinfecção alimentar de tipo relativamente brando. Os alimentos em questão eram produtos lácteos ou carnes entre os quais o leite evaporado.

Por outro lado, MOORE (23), num amplo trabalho sobre os estreptococos e as intoxicações alimentares, afirma que "a incerteza que ainda cerca a classificação dos estreptococos fecais reflete-se na informação inadequada que se encontra na literatura sobre estreptococos e sua relação com epidemias de intoxicações alimentares". Ainda nesse mesmo sentido, SIHERMAN, SMILEY & NIVEN JR. (32), estudando um estreptococo que havia sido responsabilizado por toxinfecções alimentares contraídas pela ingestão de queijo, identificaram-no como sendo o *Streptococcus faecalis*, pertencente ao grupo sorológico D de Lancefield.

NIVEN JR. & WHITE (27), estudando uma coleção de 113 culturas de estreptococos, isoladas de 100 casos de endocardite bacteriana

sub-aguda, atribuíram cinco casos ao *Streptococcus faecalis*, que foi veiculado, provavelmente, por alimentos lácteos.

Em última análise, portanto, é bastante difícil avaliar-se o grau de contaminação dos alimentos. Para os de origem animal, cuja elaboração envolve, na maioria das vezes, manipulação diversa, estando, por isso, sujeitos a uma enorme série de alterações de ordem física, química e biológica, é realmente difícil formar idéia exata sobre as condições higiênico-sanitárias que comandaram as variadas fases de preparação dos produtos, desde a obtenção da matéria-prima até a sua manipulação, distribuição e momento de consumo.

Por outro lado, os serviços de inspeção sanitária sempre buscaram um método laboratorial que permitisse, de forma segura, aquilatar as circunstâncias que dominaram durante a fabricação de determinado alimento; em última análise, um processo através do qual seja possível ter-se reflexo fiel e rápido das condições higiênicas que cercaram a preparação. O problema torna-se evidentemente sério, quando se atenta para o fato de que nem todos os alimentos mostram, de forma nítida e, sobretudo, facilmente avaliável, quando foram elaborados precariamente. Determinadas incorreções, perpetradas durante a tecnologia de certos gêneros alimentícios, podem ficar mascaradas pelas imposições de algumas manobras concernentes à sua tecnologia. É o caso de alimentos cozidos que, embora conspurcados durante a sua fabricação, pela atuação de operários inexperientes ou pela adoção de técnicas inadequadas, não apresentam alterações visíveis após o preparo, às vezes nem mesmo mediante certos testes de laboratório, visto terem sido tratados pelo calor.

Afora a incontestável importância que representa a matéria-prima como fator de contaminação, das imperfeições e irregularidades cometidas durante a manipulação dos alimentos, são realmente sérias aquelas que redundam na contaminação dos produtos por excretas humanas ou de animais. A poluição fecal dos alimentos revela, também, precariedade das condições higiênico-sanitárias do estabelecimento e das pessoas que, direta ou indiretamente, tenham tido contato com os produtos. Além disso, tais excrementos podem se constituir, por vezes, em veículo de determinados germes, responsáveis por um número relativamente grande de doenças no homem.

Aliás, a ocorrência de microrganismos nos alimentos consumidos pelo homem, foi constatada já nos primórdios da era bacteriológica. Estendendo-se o raciocínio de CHRISTOVÃO (13) aos alimentos, pode-se afirmar que o risco de toxinfecção ligado aos produtos contaminados prende-se, em grande parte, à presença nêles de microrganismos patogênicos provenientes das fezes e, eventualmente, da urina de indivíduos doentes ou portadores de germes. Assim, o perigo de transmissão de doença infecciosa através dos alimentos, está representado, principalmente, pelas doenças infecciosas intestinais.

Ora, o problema em saber se determinado produto alimentício pode ser dado a consumo sem riscos para o consumidor, é parcialmente resolvido ao se constatar se êle foi ou não poluído por fezes o que, bacteriológicamente, é conseguido procurando-se nêle bactérias fecais. Destas, as patogênicas são, reconhecidamente, de difícil detecção e isolamento, porquanto crescem dificilmente em meios de cultura comuns ou, então, não conseguem competir com outros organismos em meios artificiais, em razão do que o seu desenvolvimento é bastante demorado.

Tais dificuldades concernentes à pesquisa dos germes patogênicos, levaram os estudiosos a procurarem um germe ou, então, um grupo de germes que se associassem normalmente aos patogênicos intestinais e fôssem de mais fácil isolamento; êsses germes, sendo menos exigentes quanto aos fatores de crescimento, de mais fácil identificação e menos perigosos em relação às possibilidades de contaminação e disseminação, poderiam funcionar como reveladores da possível presença dos patogênicos em alimentos.

À luz destas considerações, o presente estudo foi conduzido para determinar a viabilidade de coliformes e enterococos em produtos lácteos de diferente tecnologia, o que, parece, proporcionará alguns subsídios para se aquilatar a adequação de cada um como microrganismo satisfatório na avaliação da contaminação fecal dos alimentos. Com êsse propósito procurou-se comparar a incidência dêsses germes em manteiga sem sal, em queijo "Minas" fresco e duro, em queijo Prato, em leite pasteurizado tipo "C", em queijo tipo "Muzzarella", em leite em pó integral e desnatado e em queijo tipo "Parmezão". Observou-se, portanto, a resistência dêsses germes em face às manobras tecnológicas perpetradas durante a elaboração dos produtos referidos.

MATERIAL E METODOS

Amostras de leite, leite em pó, manteiga e queijos, num total de 214, coletadas pela Inspetoria Regional do Serviço de Inspeção de Produtos Agro-Pecuários e Materiais Agrícolas (SIPAMA), em alguns estabelecimentos sob sua jurisdição, localizados no Estado de São Paulo, constituíram o material utilizado no presente estudo. Foram analisadas 39 amostras de manteiga sem sal; 26 de queijo "Minas" fresco; 18 de queijo "Minas" duro; 19 de queijo Prato; 17 de leite pasteurizado tipo "C"; 19 de queijo tipo "Muzzarella"; 32 de leite em pó integral; 23 de leite em pó desnatado e 21 de queijo tipo "Parmezão".

Os meios de cultura seletivos empregados foram o caldo bile verde brilhante a 2% (Difco n.º 0007-01) e o agar Levine EMB (Difco n.º 0005-01), para a pesquisa de coliformes, enquanto que para a detecção dos enterococos foram utilizados os meios preconizados por

LITSKY, MALLMANN & FIFIELD (22), modificados por RAJ, WIEBE & LISTON (30) e o agar com tetrazólio e acetato de tálio (BARNES (4)).

O meio de cultura preconizado por LITSKY, MALLMANN & FIFIELD (22), compreende duas fases: uma presuntiva, cujo substrato básico é a azida sódica (NaN_3) e a dextrose (AD) e uma confirmativa, onde aparecem, além da azida sódica e da dextrose, o corante etil violeta (EVA). A composição, em gramas por cento, das duas fases é a seguinte: FASE PRESUNTIVA (AD): triptose, 2,0; dextrose, 1,5; NaCl , 0,5; K_2HPO_4 , 0,27; KH_2PO_4 , 0,27; NaN_3 , 0,02. FASE CONFIRMATIVA (EVA): triptose, 2,0; dextrose, 1,5; NaCl , 0,5; K_2HPO_4 , 0,27; KH_2PO_4 , 0,27; NaN_3 , 0,04.

Estes meios, entre muitos utilizados no isolamento e enumeração dos enterococos, foram os preferidos tendo em vista a simplicidade de técnica e a especificidade para microrganismos do grupo sorológico D de Lancefield, requisitos comprovados pelos autores em um amplo estudo sobre a eficiência de meios seletivos para os germes em questão. Inicialmente usado como teste para enterococos em amostras de águas de rios contaminados por esgoto, o meio de LITSKY, MALLMANN & FIFIELD (22), era constituído originalmente pela primeira fase; observou-se, entretanto, que as bactérias Gram negativas eram inibidas e que alguns formadores de esporos como o *Bacillus subtilis* conseguiam crescer. Essa razão levou os autores a adicionarem um outro agente inibidor, necessário para remover as bactérias Gram positivas que não fossem enterococos. Nessas condições, um corante bacteriostático, inibidor de bactérias Gram positivas, o etil violeta, foi utilizado. Passou-se, então, a usar o meio com duas fases distintas, a presuntiva, empregando a azida sódica e a dextrose, e a confirmativa, o etil violeta, a azida sódica e a dextrose, como substâncias fundamentais.

Os estudos de LITSKY, MALLMANN & FIFIELD (22) justificam a aplicação dos meios citados para a pesquisa de enterococos pois, como concluíram esses autores, os resultados fornecidos são particularmente interessantes quanto ao fato da especificidade dos meios para aqueles germes, uma vez que em tôdas as provas realizadas ficou patente a inibição das bactérias Gram negativas e Gram positivas (que não enterococos).

Tendo em vista os ótimos resultados obtidos ultimamente com os meios descritos (BARNES (4); LARKIN, LITSKY & FULLER (20, 21); LITSKY, MALLMANN & FIFIELD (22), resolveu-se usá-los na presente pesquisa, mas, com a modificação sugerida por RAJ, WIEBE & LISTON (30), os quais, introduzindo o azul de bromo timol (na concentração de 0,003%) à primeira fase do meio, conseguiram maior especificidade quando o mesmo era usado para a detecção de enterococos em alimentos. Além disso, para maior segurança no teste

confirmativo, procurou-se um meio sólido que pudesse referendar os resultados obtidos na segunda fase: o agar com tetrazólio e acetato de tálio, recomendado por BARNES (4).

Relativamente à técnica adotada, cujo esquema apresenta-se na Figura I, variou de conformidade com o produto analisado, segundo os métodos preconizados pelo "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (3) para a pesquisa bacteriológica do leite, do leite em pó, da manteiga e dos queijos. De forma geral, recebida a amostra no laboratório, procedia-se a diluições decimais do material, usando sempre a solução de Ringer como líquido diluidor. A seguir, alíquotas idênticas de cada diluição (1 ml) eram semeadas, concomitantemente, nos meios empregados como presuntivos. Após incubação por 48 horas a 35°C, cada tubo positivo de CBVB era confirmado, semeando-se 0,1 ml de seu conteúdo no meio sólido de agar Levine EMB (ALEMB). Decorridas 24 horas de incubação a 35°C, caso as colônias desenvolvidas no ALEMB mostravam-se típicas para coliformes, então computava-se como definitivo o resultado constatado nos tubos de CBVB, resultado êsse interpretado numericamente através do número mais provável (3). Na eventualidade de que algum tubo positivo de CBVB não fornecesse colônias típicas, era êle desprezado e não considerado para a interpretação numérica.

Para os enterococos foram procedidas duas confirmações. Das diluições eram semeados volumes idênticos (1 ml) em séries de tubos com o meio AD. Após incubação por 48 horas a 37°C, os tubos positivos eram confirmados em tubos com o meio EVA. Passadas outras 48 horas de incubação a 37°C, os tubos EVA positivos eram reconfirmados no meio sólido de agar com tetrazólio e acetato de tálio (ATAT), num volume de 0,1 ml de cada tubo. Caso neste último meio se desenvolvessem colônias típicas, ou melhor, se todos os tubos positivos na segunda fase do meio de LITSKY, MALMANN & FIFIELD (22), modificado fornecessem, pela semeadura no meio ATAT, resultados também positivos, então consideravam-se como definitivos os resultados obtidos no meio EVA, os quais eram computados pelo número mais provável (3).

RESULTADOS

A quantidade de germes coliformes e enterococos, determinada segundo a técnica descrita no capítulo de Material e métodos, pode ser apreciada nas Tabelas de I a IX, que mostram o teor desses microrganismos para cada um dos produtos analisados.

Os Quadros de Associação, que aparecem após cada Tabela resumem a análise estatística dos resultados, determinada à custa do aspecto qualitativo. Assim, para a Tabela I, onde são apresentados os teores em coliformes e enterococos encontrados em 39

amostras de manteiga sem sal, o Quadro de Associação correspondente mostra que existem 26 resultados concordantes (relativamente ao sinal positivo ou negativo), entre as provas para a detecção de coliformes e para a detecção de enterococos. Dos 13 resultados discordantes, 11 foram negativos para germes coliformes e positivos para germes enterococos, enquanto que 2 foram negativos para enterococos e positivos para coliformes. Tais resultados, interpretados pelo teste da binomial, mostraram maior positividade para a presença de enterococos em relação à de coliformes, com significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

Da mesma forma, a Tabela II apresenta os teores em coliformes e enterococos detectados em 26 amostras de queijo "Minas" fresco. O Quadro de Associação correspondente demonstra que existem 20 resultados concordantes entre as duas provas; dos 6 discordantes, 5 foram negativos para germes coliformes e positivos para germes enterococos, e apenas 1 foi negativo para enterococo e positivo para coliforme. Esses resultados, interpretados pelo teste da binomial, mostraram maior positividade para a presença de enterococos em relação à de coliformes, porém não houve significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

Relativamente ao queijo "Minas" duro, a Tabela III reúne os resultados obtidos com 18 amostras desse produto. O Quadro de Associação correspondente mostra 9 resultados concordantes; dos 9 discordantes, 8 foram negativos para germes coliformes e positivos para germes enterococos e 1 foi negativo para enterococos e positivo para coliformes. Calculados pelo teste da binomial, mostraram maior positividade para a presença de enterococos em relação à de coliformes, com significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

A Tabela 4 resume os resultados obtidos com 19 amostras de queijo Prato. O Quadro de Associação correspondente revelou 13 resultados concordantes; dos 6 discordantes, 5 foram negativos para germes do grupo coliforme e positivo para germes do grupo enterococo, enquanto que apenas 1 foi negativo para germes do grupo enterococo e positivo para germes do grupo coliforme. A interpretação estatística mostrou, pelo teste da binomial, maior positividade para a presença de enterococos em relação à de coliformes, com não significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

Já, a pesquisa dos dois grupos de germes em leite pasteurizado tipo "C", aparece na Tabela V, que mostra os resultados com 17 amostras desse produto. O Quadro de Associação operou 12 resultados concordantes; dos resultados discordantes, 5 foram negativos para germes coliformes e positivos para enterococos, não havendo nenhum resultado negativo para enterococos e positivo para coliformes. Conseqüentemente, a interpretação estatística mostrou po-

sitividade exclusiva para a presença de enterococos em relação à de coliformes, com significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

A comparação da incidência de germes coliformes e enterococos foi executada ainda, em 19 amostras de queijo tipo "Muzzarella", como se pode ver ao examinar-se a Tabela VI. Do estudo do Quadro de Associação correspondente, depreende-se que foram concordantes 7 resultados e discordantes 12, dos quais 11 foram negativos para germes coliformes e positivos para enterococos e, 1 apenas, negativo para enterococos e positivo para coliformes. Aplicando o teste da binomial, demonstrou-se a positividade maior para a presença de enterococos em relação à de coliformes, com significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

Por outro lado, o teor em coliformes e enterococos em leite em pó integral foi avaliado à custa de 32 amostras do produto, estando os resultados coligidos na Tabela VII. O Quadro de Associação correspondente indica 2 resultados concordantes e 30 discordantes, dos quais a totalidade ofereceu positividade para germes enterococos e negatividade para germes coliformes, evidenciando, pelo teste binomial, positividade exclusiva daqueles em relação à estes. Houve, portanto, significância dos resultados, ao nível convencional de 5% (teste monocaudal).

Com referência ao leite em pó desnatado, foram realizadas 23 análises com esse produto, estando os resultados esquematizados na Tabela VIII. O Quadro de Associação não revelou nenhum resultado concordante; dos discordantes, 23 foram negativos para coliformes e positivos para enterococos. Tais resultados, interpretados estatisticamente pelo teste binomial, fazem concluir por uma positividade maior para a presença de enterococos em relação à de coliformes, com significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

Finalmente, a Tabela IX apresenta os teores em coliformes e enterococos encontrados em 21 amostras de queijo tipo "Parmezão". O Quadro de Associação mostra que existem 3 resultados concordantes e 18 discordantes, dos quais todos eles foram negativos para coliformes e positivos para enterococos. Há, portanto, definição de uma positividade maior para a presença de enterococos em relação à de coliformes, como demonstrou-se pelo teste da binomial, com franca significância ao nível de 5% (teste monocaudal).

Quanto ao aspecto quantitativo dos resultados, considerando-se os casos de concordância positiva (positividade tanto para coliformes quanto para enterococos) e analisando-se estatisticamente a diferença entre os teores de germes dos dois grupos, através o teste *t* aplicado à variável transformada (transformação logarítmica), encontrou-se uma supremacia numérica de enterococos em relação a coliformes, significativa ao nível de 5% (teste monocaudal), para

a manteiga sem sal, para os queijos "Minas" fresco e duro, para o queijo Prato, para o queijo tipo "Muzzarella" e para o queijo tipo "Parmezão" (Tabelas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX). Quanto aos leites em pó integral e desnatado (Tabelas VII e VIII), a simples inspeção das respectivas tabelas basta para evidenciar a predominância numérica dos enterococos sobre os coliformes.

DISCUSSÃO

O estabelecimento de padrões bacteriológicos para os alimentos de origem animal, foi, é e parece que será preocupação constante de inspetores e tecnologistas. Particularmente para o leite e produtos dele derivados, a determinação de um índice que reflita as condições higiênico-sanitárias de produção e manipulação, reveste-se da mais alta importância. Tradicionalmente utilizados para aquilatar a qualidade bacteriológica da água e do leite, a *E. coli* e o grupo coliforme, foram sendo gradativamente estendidos a outros alimentos com a mesma finalidade. Entretanto, evidências existem segundo as quais os microrganismos usualmente empregados como indicadores de poluição fecal para a água e para o leite, são insatisfatórios quando aplicados para outros alimentos (KERELUK & GUNDERSON (19); LARKIN, LITSKY & FULLER (20, 21); ZABAROWSKI, HUBER & RAYMAN (38)). Esta afirmativa, segundo KELLY (cit. RAJ & LISTON (28)), é verdadeira inclusive no caso de moluscos, para os quais os métodos de avaliação da qualidade bacteriológica através dos coliformes, têm sido usados por muitos anos. É amplamente reconhecido que a contagem de coliformes pelo número mais provável tem utilidade limitada para alguns produtos, devido a origem diversa dos microrganismos incluídos no grupo coliforme, muitos dos quais derivam de fontes não humanas, podendo-se esperar normalmente a sua presença em certos produtos crus ou manufaturados.

RAJ, WIEBE & LISTON (30) assinalam, por outro lado, a insuficiência dos coliformes quando usados para avaliar o grau de poluição fecal de produtos congelados, como é o caso do pescado, enquanto HAHN & APPELMANN (15) chegaram à mesma conclusão relativamente ao suco de laranja concentrado e congelado. Efetivamente, a pequena resistência desses germes às baixas temperaturas, faz com que sejam impróprios para a finalidade pesquisada, fato que levou alguns autores (KERELUK & GUNDERSON (19); LARKIN, LITSKY & FULLER (20, 21); ZABAROWSKI, HUBER & RAYMAN (38)) a advogarem o uso dos enterococos, em substituição aos coliformes, como indicadores de contaminação fecal para produtos congelados.

Parecem, pois, úteis os estudos que esclareçam a possibilidade do índice enterococo ser utilizado para outros alimentos, mormente para aqueles que sofrem processos de industrialização e conserva-

ção mediante a aplicação do frio, calor e desidratação. Os resultados obtidos no presente trabalho talvez contribuirão para futuras argumentações nesse setor tão discutido da bacteriologia alimentar. Assim, um ponto que acreditamos ter ficado patente, diz respeito à possibilidade dos coliformes serem destruídos durante algumas fases de elaboração tecnológica dos produtos, caracterizadas pela aplicação de altas temperaturas, de desidratação, de longos períodos de maturação e armazenamento.

Portanto, na dependência das diversas manobras que envolvem a tecnologia de alguns produtos, os coliformes podem ser destruídos ou ter o seu número diminuído, e a sua ausência em provas bacteriológicas posteriores poderá levar a errôneas interpretações acerca das condições sanitárias que caracterizaram as fases de elaboração do produto. Este fato parece bem demonstrado no presente estudo, onde procuramos analisar produtos de tecnologia variada, o que possibilitou uma comparação da incidência de coliformes e enterococos.

Veja-se, por exemplo, os resultados obtidos com produtos cuja tecnologia compreende, em uma de suas fases, o emprêgo de temperaturas altas, como o queijo Prato (Tabela IV), o leite pasteurizado tipo "C" (Tabela V) e o queijo tipo "Muzzarella" (Tabela VI). Houve patente predominância numérica dos enterococos sobre os coliformes, estatisticamente demonstrada através do teste *t* aplicado à variável transformada (transformação logaritmica), com significância ao nível de 5% (tese monocaudal). Em contraposição, a positividade para enterococos e a negatividade para coliformes mostrou resultados não significantes ao nível de 5% para o queijo "Minas" fresco (Tabela II e respectivo Quadro de Associação), embora o teor de germes enterococos superasse, numericamente, o de coliformes quando havia positividade para os dois grupos (teste *t* aplicado à variável transformada). Ora, nada mais justo de esperar-se tais resultados para um produto que, na maioria das vezes, é preparado com leite não pasteurizado, não sofre praticamente qualquer processo de maturação ou outra manobra tecnológica e que, por isso, apresenta idênticas condições de desenvolvimento tanto para coliformes quanto para enterococos.

Parece demonstrada, portanto, nos produtos citados, a maior resistência dos enterococos sobre os coliformes relativamente às temperaturas elevadas. A propósito, segundo INGRAM & BARNES (16), a resistência dos estreptococos fecais ao calor é aparentemente governada por fatores como o tipo do meio, o pH, a idade do "inoculum". JENSEN (17) afirma que essa resistência é aumentada quando óleos ou gorduras são usados como meio de suspensão; assim, os microrganismos que são destruídos em leite, a 67,7°C em 30 minutos, quando suspensos em manteiga derretida somente foram destruídos em 50 minutos a 115°C e em 20 minutos a 120°C.

WHIE (36) mostrou, por outro lado, que o tempo de redução decimal do número dêsses germes, a 60°C, é de 5 a 10 vêzes maior em leite do que em solução de Ringer, o que demonstra a influência do meio sôbre a sobrevivência dos enterococos.

Tendo presentes as conclusões de INGRAM & BARNES (16), JENSEN (17) e WHITE (36), considerem-se os resultados obtidos com a análise da manteiga sem sal, produto que sofre a interferência de inúmeros fatores, dos quais os mais importantes são os que induzem as gorduras à degradação, hidroliticamente (na primeira fase), com o aparecimento de ácidos graxos livres e oxidativamente (na segunda fase), originando aldeídos e cetonas. Dentre os fatores citados, a luz e a umidade desempenham papel preponderante, acarretando profundas modificações na composição química do produto, que afetam a sobrevivência da flora microbiana eventualmente existente, destruindo alguns microrganismos, permitindo o desenvolvimento de outros, procedendo enfim, a uma verdadeira seleção. Tais condições parecem restringir a sobrevivência da flora coliforme, não interferindo (ou, pelo menos, interferindo em menos grau) sôbre os estreptococos fecais. Nossos resultados parecem referendar os de ALLEN & FABIAN (2), no concernente à maior resistência dos enterococos às modificações do meio, particularmente no que se relaciona com pH baixo e presença de ácidos graxos livres; efetivamente, o Quadro n.º 1 é ilustrativo ao comprovar essa maior resistência dos enterococos, estatisticamente significante tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo. De qualquer modo, parece haver necessidade de investigações futuras sôbre êste problema, que venham responder definitivamente acêrca da resistência dêsses germes aos mais variados ambientes.

Relativamente aos produtos cuja tecnologia compreende longos períodos de "cura" ou maturação, devem ser ressaltados os resultados obtidos no trabalho em pauta. Apresentaram-se, ainda desta vez, maiores vantagens para os enterococos, traduzindo a maior resistência dêsses germes à essa circunstância. Assim, a análise das 21 amostras de queijo tipo "Parmezão" (Tabela IX) revelou significativa positividade para enterococos em relação a coliformes, além de uma supremacia numérica dos primeiros em relação aos segundos quando havia positividade para os dois grupos, fato estatisticamente comprovado. O mesmo ocorreu com o queijo "Minas" duro, o qual sofre também longo período de cura. A propósito, convém comparar os resultados obtidos com os queijos "Minas" duro (Tabela III) e tipo "Parmezão" (Tabela IX) com aqueles fornecidos pelo queijo "Minas" fresco (Tabela II); tal comparação oferece argumentos para concluir sôbre a maior resistência dos enterococos nos produtos lácteos armazenados por longos períodos. Efetivamente, é altamente significante o fato de que no queijo "Minas" fresco houve positividade tanto para enterococos quanto para

coliformes, enquanto no tipo "Parmezão" e "Minas" duro constatou-se franca positividade para enterococos ou, ao menos, supremacia numérica indiscutível destes germes sobre aqueles. Ora, tais resultados são justificados, tendo-se em conta as profundas transformações que se instalam na massa dos produtos "curados", iniciando-se com a acidificação oriunda da formação de ácido láctico, a qual já é suficiente para inibir grande número de espécies bacterianas, entre as quais os representantes do grupo coliforme.

Finalmente, devem merecer destaque especial os resultados obtidos com a análise dos leites em pó integral e desnatado, para os quais verificou-se predomínio total dos enterococos, com negatividade completa dos coliformes. Estes achados confirmam ainda uma vez a resistência dos enterococos às temperaturas elevadas e à dessecação, motivo pelo qual deveriam merecer mais atenção no relativo a serem utilizados, em substituição aos coliformes, como microrganismos testes de poluição fecal para os produtos citados. Realmente, os nossos resultados referendam a opinião de BROWN & GIBBONS (7) e SOLOWEY & WATSON (34), muito embora estes autores tenham trabalhado com ovos em pó. Entretanto, a tecnologia de elaboração deste produto aproxima-se bastante, no que se refere às temperaturas e às condições de desidratação, daquela utilizada para leites em pó. Realmente, em um ou outro produto, a matéria-prima sofre a ação de temperaturas bastante elevadas, quer na fase de pasteurização do leite (80°C), quer no "spray", onde o impacto com o ar aquecido faz o leite atingir temperaturas que oscilam ao redor de 100°C. Segundo BUTTIAUX (12), traduzindo a opinião de muitos autores, essa resistência dos enterococos deveria ser encarada como uma razão para usá-los, em substituição aos coliformes ou em complementação a eles, como indicadores de poluição fecal.

Resta-nos comentar sobre a possibilidade de os enterococos serem, acidentalmente, usados como fermentos lácticos selecionados para a fabricação da manteiga e dos queijos. Este é um fato que deve ser argumentado, pois a utilização de "starters" no fabrico desses produtos, poderia trazer alguma confusão quando os estreptococos fecais fossem usados como indicadores de poluição. É sabido que tais "starters" são representados principalmente pelo *Streptococcus lactis* e pelo *Streptococcus cremoris*, germes não pertencentes ao grupo enterococo e propositalmente adicionadas à massa para fermentá-la. Bioquimicamente, os estreptococos lácticos aproximam-se bastante dos estreptococos fecais e a presença destes últimos nos produtos poderia não traduzir realmente poluição fecal, mas, simplesmente, a adição acidental de estreptococos fecais (associados com os "starters"), o que levaria a uma falsa interpretação dos resultados, mesmo porque os produtos lácteos de modo geral representam um ótimo ambiente para a maioria dos

estreptococos. A estas considerações pode-se replicar unicamente lembrando que só resta confiar nos meios de cultura seletivos os quais, funcionando a contento, seriam os únicos a resolver, pelo menos no estado atual dos conhecimentos, o problema em questão.

SUMMARY

Researching the representatives of the enterococci and coliform groups in milk and dairy products, in a total of 214 samples, and interpreting the results by means of the MPN, it was possible to determine the viability of these bacteria in dairy foods of a varied technology (saltless butter, hard and soft "Minas" cheese, "muzzarella" and "parmeção" cheese, "C" type pasteurized milk, whole and skimmed powdered milk). It was evidenced that the higher or lower occurrence of microorganisms in each group is conditioned to the chemical composition and to the technological variations inherent to the preparation of each type of product.

Thus, there was a numerical preponderance, statistically evidenced, of enterococci over coliforms in saltless butter, hard and soft "Minas" cheese, "C" type pasteurized milk, whole and skimmed powdered milk, and in the "muzzarella" and "parmeção" types of cheese. On the other hand, the chances of finding positive results for enterococci and negative for coliform are greater than the inverse in the case of saltless butter, hard "Minas" cheese and the "muzzarella" and "parmeção" types, and in the case of the "C" type pasteurized milk, and in the whole and skimmed powdered. There was an identical probability for the fresh "Minas" and Prato types of cheese.

Finally, the investigation concerning the prevalence of one or the other group in the foods referred to, seems to contribute to future considerations about adequacy as indicators of fecal pollution.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, C. H. FABIAN, F. W. — Comparison of *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* as a test organisms to determine the sanitary quality of food. Part I. *J. Milk Food Technol.*, 17(7):204-218, 1954.
2. ALLEN, C. H.; FABIAN, F. W. — Comparison of *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* as a test organisms to determine the sanitary quality of food. Part II. *J. Milk Food Technol.*, 17(8):237-242, 1954.
3. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 10^{ed}, New York, American Health Association, 1953.
4. BARNES, E. M. — Differential and selective media for the faecal streptococci. *J. Sci. Food Agric.*, 10(12):656-662, 1959.

5. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA — Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decretos Federais n.ºs 30.691, de 29-3-52 e 1.255, de 25-6-62, p. 40-41, 155, 1953.
6. BREED, R. S.; NORTON, J. F. — Nomenclature of the colon group. *Amer. J. publ. Hlth.*, 27(6):560-563, 1927.
7. BROWN, H. J.; GIBBONS, N. E. — Enterococci as an index of fecal contamination in egg products. *Canadian J. Res.*, 28(5):107-117, 1950.
8. BUCHBINDER, L.; OSLER, A. G.; STEFFEN, G. I. — Studies in enterococcal food poisoning. I. The isolation of enterococci from implicated in several outbreaks of food poisoning. *Publ. Hlth. Rep.*, 63(4): 109-118, 1948.
9. BURTON, M. O. — Comparison of coliform and enterococcus organisms as indices of pollution in frozen foods. *Food Res.*, 14(5):434-438, 1949.
10. BUTTIAUX, R. — Sur quelques faits nouveaux concernant les toxi-infections alimentaires. *Rev. méd. Liege*, 11:521-533, 1956.
11. BUTTIAUX, R. — Les streptocoques fécaux dans les eaux d'alimentation. Recherche. Espèces rencontrées. Signification. *Ann. Inst. Pasteur*, 95 (2):142-148, 1958.
12. BUTTIAUX, R. — The value of the association *Escherichiae* Group D streptococci in the diagnosis of contamination in foods. *J. applied Bact.*, 22:153-158, 1959.
13. CHRISTOVÃO, D. A. — Exame e controle bacteriológicos da água, in "Operação e manutenção de estações de tratamento de água, São Paulo, 1965". São Paulo, FHSP/OPAS, 1965, p. 125-198.
14. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION — Milk Hygiene. Geneva, World Health — Organization, 1962 p. 308-310.
15. HAHN, S. S.; APLEMAN, M. D. — Microbiology of frozen orange concentrate. I. Survival of enteric organisms in frozen orange concentrate. *Food Technol.*, 6(4):156-158, 1952.
16. INGRAM, M.; BARNES, E. — Streptococci in pasteurized canned hams. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 7:101-114, 1955.
17. JENSEN, L. B. — Microbiology of meats. 3rd ed.. Illinois Garrard Press, 1954.
18. KELLY, C. B.; ARCISZ, W. — Survival of enteric organisms in Shell fish Public. *Health Rept's.*, 69(2):1205-1210, 1954.
19. KERELUK, K.; GUNDERSON, M. F. — Studies in the bacteriological quality of frozen meat pies. I. Bacteriological survey of some commercially frozen meat pies. *Appl. Microbiol.*, 7:320-323, 1959.
20. LARKIN, E. P.; LITSKY, W.; FULLER, J. E. — Fecal streptococci in frozen foods. I. A bacteriological survey of some commercially frozen foods. *Appl. Microbiol.*, 3(2):98-101, 1955.
21. LARKIN, E. P.; LITSKY, W.; FULLER, J. E. — Incidence of fecal streptococci and coliform bacteria in frozen fish products. *Amer. J. publ. Hlth.*, 46(4):464-468, 1956.

22. LITSKY, W.; MALLMAN, W. L.; FIFIELD, C. W. — A new medium for the detection of enterococci in water. *Amer. J. publ. Hlth*, 43(7): 873-879, 1953.
23. MORRE, M. — Streptococci and food poisoning. *J. appl. Bact.*, 18(3): 606-618, 1955.
24. MORRIS, W.; WEAVER, R. H. — Streptococci as indices of pollution in well-waters. *Appl. Microbiol.*, 2(5):282-284, 1954.
25. MOSSEL, D. A. A.; VAN DIEPEN, H. M. J.; BRUIN, A. S. — The enumeration of faecal streptococci in foods, using packer's crystal violet sodium azide blood agar. *J. appl. Bact.*, 20(2):265-272- 1957.
26. NIVEN, JR., C. F. — Microbial Indexes of food quality: fecal streptococci. In *Slanetz, L. W.; Slanetz, L. W.; Chichester, C. O.; Gaufin, A. R. & Ordal, Z. J. — Microbiological quality of foods.* New York, Academic Press, 1963.
27. NIVEN JR., C. F. & WHITE, J. C. — A study of enterococci associated with subacute bacterial endocarditis. *J. Bact.*, 51(6):790, 1946.
28. RAJ, H.; LISTON, J. — Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. I. *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol.*, 9(2):171-174, 1961.
29. RAJ, H.; LISTON, J. — Survival of bacteria of public health significance in frozen sea foods. *Food Tech.*, 15(10):429-434, 1961.
30. RAJ, H.; WIEBE, W. J.; LISTON, J. — Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. II. Enterococci. *Appl. Microbiol.*, 9(4):295-303, 1961.
31. SHERMAN; J. M. — The streptococci. *Bact Rev.*, 1(1):3-97, 1937.
32. SHERMAN, J. M.; SMILEY, K. L.; NIVEN JR., C. F. — The identity of a streptococcus associated with food poisoning from cheese. *J. Dairy Sci.*, 26(4):321-323, 1943.
33. SILLIKER, J. H.; DEIBEL, R. H. — On the association of enterococci with food poisoning. *Bact. Proc.* 48, 1960.
34. SOLOWEY, M.; WATSON, A. J. — The presence of enterococci in spray dried whole egg powder. *Food Res.*, 16(3):187-191, 1951.
35. U. S. DEPARTAMENT OF HEALTH, EDUCATION, and Welfare. Public Health Service. Milk Ordinance and Code. p. 37, 47, 40, 50, 184; 1953.
36. WHITE, H. R. — The heat disinfection of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus lactis*. *Proc. Soc. appl. Bact.*, 15:8,1952.
37. WILSON, T. E.; McCLESKLY, C. S. — Indices of pollution in oysters. *Food Res.*, 16(4):313-319, 1951.
38. ZABAROWSKI, H.; HUBER, D. A.; RAYMAN, M. M. — Evaluation of microbiological methods used for the examination of precooked frozen foods. *Applied Microbiol.*, 6:91104, 1958.

Fig. 1 — Sistemática da técnica adotada para a pesquisa e cômputo de germes dos grupos coliforme e enterococo incidentes em leite e produtos de laticínios.

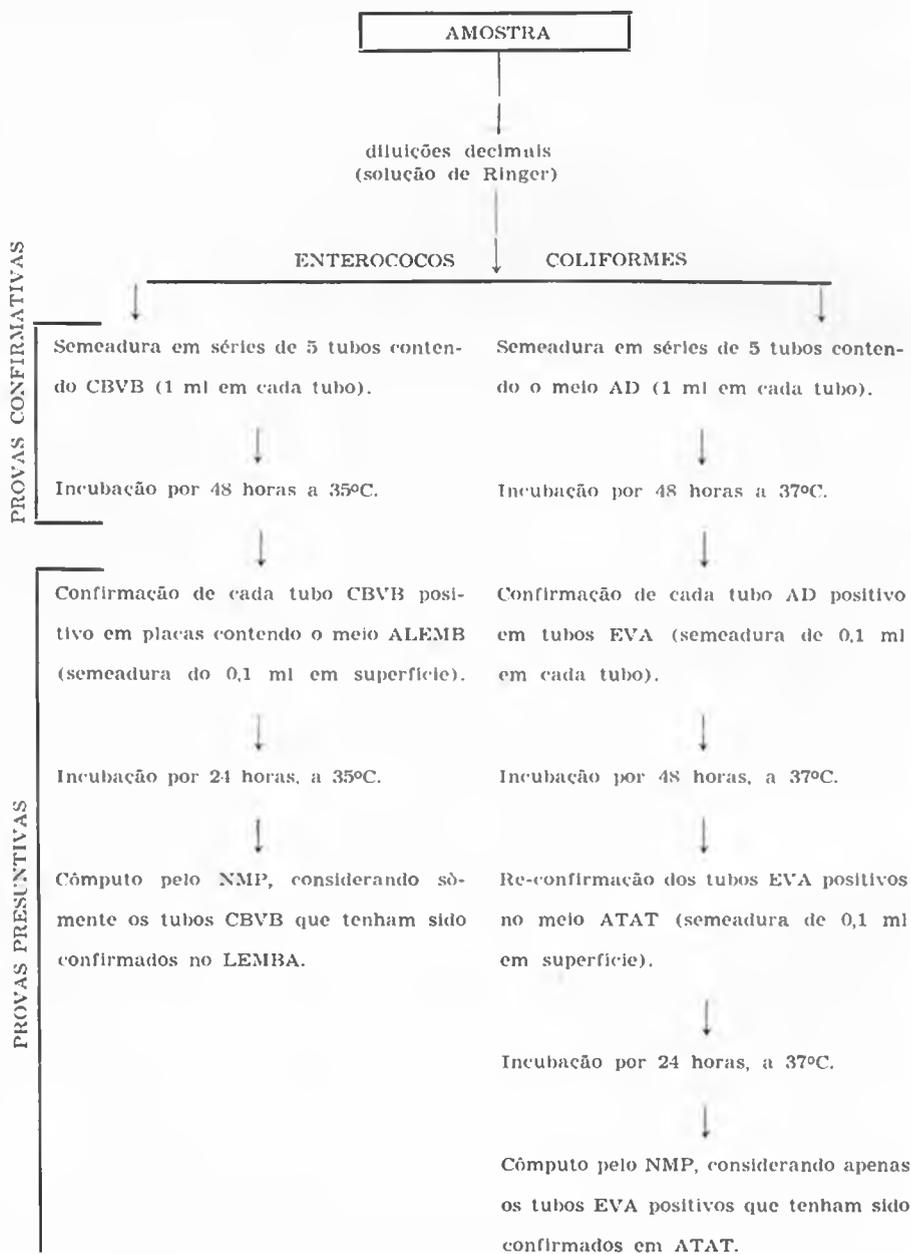


TABELA I — Teor em coliformes e enterococos em MANTEIGA SEM SAL. (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	13.000	47.000
2	9.500	42.800
3	2.400	negativo
4	240.000.000	600.000.000
5	negativo	1.500.000
6	negativo	12.000.000
7	700.000	5.400.000
8	22.000	240.000
9	negativo	4.900
10	15.000	2.300.000
11	negativo	negativo
12	20.000	570.000
13	negativo	720.000
14	negativo	45.000
15	negativo	negativo
16	negativo	9.200.000
17	2.400.000	9.200.000
18	12.000.000	110.000.000
19	16.000.000	24.000.000
20	9.200.000	23.000.000
21	35.000.000	240.000.000
22	24.000.000	3.500.000
23	1.000.000	17.000.000
24	240.000.000	725.000.000
25	1.800.000	2.250.000
26	92.000.000	negativo
27	54.000.000	192.000.000
28	230.000	19.500.000
29	negativo	54.000.000
30	2.000.000	70.000
31	130.000	350.000
32	negativo	110.000
33	1.100.000	20.000.000
34	1.300.000	200.000
35	negativo	negativo
36	negativo	3.500.000
37	negativo	negativo
38	negativo	2.300
39	negativo	450

Quadro de associação referente à Tabela I

Enterococos	Coliformes		Total
	—	+	
+	11	22	33
—	4	2	6
Total	15	24	39

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).

TABELA II — Teor em coliformes e enterococos em QUEIJO "MINAS" FRESCO. (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	170.000	240.000.000
2	79.000	170.000
3	780.000	23.000.000
4	20.000	330.000
5	2.400.000	24.000.000
6	27.000.000	57.000.000
7	negativo	700.000
8	240.000.000	8.600.000.000
9	negativo	370.000
10	240.000.000	680.000
11	50.000.000	78.000.000
12	2.300.000	125.000.000
13	negativo	25.000.000
14	3.500.000	8.000.000
15	3.500.000	4.000.000
16	490.000	61.000.000
17	170.000	340.000
18	negativo	4.000.000
19	2.850.000	negativo
20	20.000	330.000
21	negativo	560.000
22	230.000	9.200.000
23	2.400.000	24.000.000
24	1.600.000	5.400.000
25	920.000	31.000.000
26	130.000	40.000.000

Quadro de associação referente à Tabela II

Enterococos	Coliformes		Total
	—	+	
+	5	20	25
—	0	1	1
Total	5	21	26

Resultados não significantes ao nível de 5% (testes monocaudal).

TABELA III — Teor em coliformes e enterococos em QUEIJO "MINAS" DURO. (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	negativo	9.000.000
2	24.000.000	24.000.000
3	4.000	1.300.000
4	negativo	160.000.000
5	4.500	240.000.000
6	negativo	200.000
7	2.000	4.900.000
8	4.600	negativo
9	negativo	24.000.000
10	negativo	1.600.000
11	2.400.000	2.400.000
12	negativo	2.400.000
13	1.100.000	24.000.000
14	45.000	24.000.000
15	negativo	11.000.000
16	79.000	13.000.000
17	negativo	7.200.000
18	20.000	2.100.000

Quadro de associação referente à Tabela III

Enterococos	Coliformes		Total
	—	+	
+	8	9	17
—	0	1	1
Total	8	10	18

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).

TABELA IV — Teor em coliformes e enterococos em QUEIJO PRATO. (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	2.400.000	24.000.000
2	240.000	490.000
3	2.400.000	1.700.000
4	negativo	35.000.000
5	490.000	6.400.000
6	430.000	9.200.000
7	160.000.000	240.000.000
8	negativo	180.000
9	20.000	180.000
10	49.000	negativo
11	negativo	260.000
12	22.000	24.000.000
13	11.000	3.500.000
14	negativo	9.200.000
15	2.400.000	24.000.000
16	35.000	4.300.000
17	240.000	24.000.000
18	2.400.000	24.000.000
19	negativo	92.000.000

Quadro de associação referente à Tabela IV

Enterococos	Coliformes		Total
	—	+	
+	5	13	18
—	0	1	1
Total	5	14	19

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).

TABELA V — Teor em coliformes e enterococos em LEITE PASTEURIZADO TIPO "C" (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	13.000	2.300
2	200	17.000
3	560	490
4	negativo	78
5	negativo	negativo
6	450	11.000
7	negativo	130
8	330	3.300
9	200	1.300
10	negativo	200
11	7.900	24.000
12	negativo	780
13	450	450
14	2.500	3.300
15	3	680
16	negativo	780
17	2.300	2.300

Quadro de associação referente à Tabela V

		Coliformes		Total
		—	+	
Enterococos	+	5	11	16
	—	1	0	1
Total		6	11	17

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).

TABELA VI — Teor em coliformes e enterococos em QUEIJO TIPO "MUZZARELLA". (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	33.000	170.000
2	4.500	1.600.000
3	350.000	2.400.000
4	20.000	negativo
5	negativo	9.200.000
6	240.000	8.100.000
7	45.000	160.000.000
8	negativo	28.000.000
9	14.000	22.000.000
10	negativo	7.000.000
11	4.500	240.000.000
12	negativo	20.000
13	negativo	400.000
14	negativo	62.000
15	negativo	61.000
16	negativo	220.000
17	negativo	2.400.000
18	negativo	24.000.000
19	negativo	16.000.000

Quadro de associação referente à Tabela VI

Enterococos	Coliformes		Total
	—	+	
+	11	7	18
—	0	1	1
Total	11	8	19

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).

TABELA VII — Teor em coliformes e enterococos em LEITE EM PÓ INTEGRAL. (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	negativo	23.000
2	negativo	negativo
3	negativo	negativo
4	negativo	233.000
5	negativo	2.833
6	negativo	11.477
7	negativo	3.450
8	negativo	2.349
9	negativo	1.466
10	negativo	3.416
11	negativo	477
12	negativo	383
13	negativo	24.000
14	negativo	3.350
15	negativo	7.900
16	negativo	1.000
17	negativo	400
18	negativo	66
19	negativo	24.000
20	negativo	24.000
21	negativo	35.000
22	negativo	13.300
23	negativo	24.000
24	negativo	24.000
25	negativo	200
26	negativo	30.000
27	negativo	16.000
28	negativo	160.000
29	negativo	13.000
30	negativo	16.000
31	negativo	1.600.000
32	negativo	24.000

Quadro de associação referente à Tabela VII

Enterococos	Coliformes		Total
	—	+	
Total	30	0	30
+	2	0	2
—	32	0	32

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).

TABELA VIII — Teor em coliformes e enterococos em LEITE EM PÓ DESNATADO. (NMP/g).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	negativo	450
2	negativo	833
3	negativo	1.850
4	negativo	2.926
5	negativo	7.900
6	negativo	24.000
7	negativo	54.000
8	negativo	490
9	negativo	400
10	negativo	24.000
11	negativo	24.000
12	negativo	8.000
13	negativo	24.000
14	negativo	2.300
15	negativo	1.900
16	negativo	3.100
17	negativo	3.500
18	negativo	1.700
19	negativo	900
20	negativo	1.300
21	negativo	150
22	negativo	18
23	negativo	230

Quadro de associação referente à Tabela VIII

		Coliformes		Total
		—	+	
Enterococos	+	23	0	23
	—	0	0	0
Total		23	0	23

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).

TABELA IX — Teor em coliformes e enterococos em QUEIJO TIPO "PARMEZÃO", (NMP/).

Amostra	Coliformes	Enterococos
1	20.000	24.000.000
2	negativo	24.000.000
3	negativo	24.000.000
4	negativo	70.000
5	negativo	24.000.000
6	negativo	191.000
7	negativo	128.550
8	negativo	9.000
9	negativo	1.600.000
10	negativo	11.800.000
11	negativo	9.900.000
12	negativo	570.000
13	negativo	33.000
14	400	2.400.000
15	negativo	240.000
16	negativo	2.300
17	79.000	13.000.000
18	negativo	49.000
19	negativo	2.400.000
20	negativo	320.000
21	negativo	560.000

Quadro de associação referente à Tabela IX

Enterecocos	Coliformes		Total
	—	+	
+	18	3	21
—	0	0	0
Total	18	3	21

Resultados significantes ao nível de 5% (teste monocaudal).