UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
E AGRÍCOLA

# Contribuição ao Estudo de Meios de Cultura para a Enumeração e Caracterização de Staphylococcus aureus

Rubem Abreu Machado
Farmacêutico — Bioquímico

ORIENTADOR:
PROF. DR. FUMIO YOKOYA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de "MESTRE" em Ciência de Alimentos.

M18 c
2833/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais, que me ensinaram a encarar o presente com otimismo e o futuro com naturalidade.

À minha querida esposa e filhos, pela dedicação e compreensão em prestados durante o longo período de ausência ao lar.

# I N D I C E

PÁG.


RESUMO ..... vi

SUMMARY ..... viii

I - INTRODUÇÃO ..... 1

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 3

1. Staphylococcus aureus ..... 3

1.1 - Evolução taxonômica ..... 3

1.2 - Interesse histórico como patógeno humano. 4

2. Principais Características do S. aureus .... 5

2.1 - Morfologia ..... 5

2.2 - Metabolismo ..... 6

2.3 - Toxinas ..... 7

2.4 - Enzimas extracelulares ..... 9

3. O Número Mais Provável (NMP) ..... 10

3.1 - Fundamento teórico e matemático ..... 10

3.2 - Suposições básicas para o método do NMP.. 18

3.3 - Aplicações do método do NMP ..... 19

3.4 - Utilização dos dados para a estimativa do NMP ..... 20

3.5 - Modificações técnicas do método do NMP .. 22

III - MATERIAL E MÉTODOS ..... 23

1. Linhagens usadas nos ensaios ..... 23

1.1 - Staphylococcus aureus ..... 23

1.2 - Micrococcus glutamicus ..... 23

2. Tipificação das linhagens de Staphylococcus aureus ..... 23

3. Ensaios Preliminares ..... 24

3.1 - Linhagem de ensaio ..... 24

3.2 - Meios de cultura ..... 24

4. Ensaios Definitivos ..... 24

4.1 - Linhagens de ensaio ..... 24

4.2 - Caracterização dos meios e reagentes ... 25

4.3 - Preparo dos meios e reagentes ..... 25

4.4 - Especificação dos equipamentos e outros. 27

4.5 - Recuperação das culturas estocadas a -20°C 27

4.5.1 - Reativação ..... 27

4.5.2 - Verificação da pureza ..... 28

4.6 - Preparo do inóculo ..... 28

4.6.1 - Semeadura em BHI caldo ..... 28

4.6.2 - Padronização da densidade bacteriana.. 29

4.7 - Preparo das diluições e inoculações dos meios ..... 30

4.7.1 - Diluições ..... 30

4.7.2 - Inoculação dos meios ..... 31

4.8 - Provas Complementares ..... 31

4.8.1 - Teste da coagulase ..... 31

4.8.2 - Teste da DNA'se (desoxi-ribonuclease). 32

IV - RESULTADOS ..... 34

1. Formulação dos Meios ..... 34

2. Caracterização das Linhagens de S. Aureus e Micrococcus ..... 35

3. Dados Comparativos da Recuperação nos dois meios ..... 35

3.1 - Staphylococcus ..... 35

3.2 - Micrococcus ..... 38

V - DISCUSSÃO ..... 41

1. Meio proposto para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de S. aureus ..... 41

2. Testes da DNA'se e da coagulase ..... 42

3. Staphylococcus versus Micrococcus glutamicus ..... 43

VI - CONCLUSÃO ..... 45

ANEXOS - Quadros, Figuras e Tabelas ..... 47

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 59

AGRADECIMENTOS ..... 65

# R E S U M O

Foram realizados ensaios para a determinação do número mais provável de 43 linhagens de Staphylococcus aureus.

Após uma série de ensaios preliminares, usando diferentes meios de cultura e modificando-lhes em alguns componentes ou mesmo acrescentando outros, foi finalmente escolhido o meio BHI como meio basal para os estudos.

As alterações efetivadas nesse meio proporcionaram uma recuperação altamente satisfatória para os estafilococos ensaiados. Basicamente essas alterações constaram do acréscimo de NaCl a 10% e vermelho neutro a 0,01 e 0,001 %.

Além das linhagens caracterizadas como coagulase e DNA'se positivas, foram também utilizadas, nos ensaios com o meio proposto para a determinação do NMP, linhagens negativas para esses testes, bem como linhagens reconhecidamente enterotoxigênicas.

Foi testado também com esse meio, uma linhagem de Micrococcus (Micrococcus glutamicus) para ser determinado o poder inibidor do corante em relação ao crescimento desse microorganismo. Esse procedimento foi adotado tendo em vista que o Micrococcus sp. apresenta condições de desenvolvimento nos substratos contendo alta percentagem de NaCl. Pelo menos para a linhagem testada, não houve crescimento algum; nem após 72 horas de incubação.

Uma das principais vantagens desse meio é que pode

rão ser feitos, após a leitura dos tubos para o número mais provável, os testes respectivos de coagulase e DNA'se. Esses testes mostraram ser bastante efetivos, tendo em vista que logo nas primeiras horas de incubação já foram evidenciados os resultados positivos. Para a verificação de falsos resultados positivos, foram usadas duas linhagens coagulase e DNA'se negativas e os resultados não foram diferentes.

# S U M M A R Y

The most probable number (MPN) technique is frequently used in food microbiology. However, many individuals are not able to understand the real meant of the method, because the statistics involved on it.

To overcome these difficulties, a review about it was introduced in this work. Certain theoretical and mathematical considerations in regard to the dilution method for estimating bacterial densities were presented.

About 43 Staphylococcus aureus strains were used, some of them are enterotoxins producer (food-poisoning staphylococci); the last were obtained from the "Food Research Institute", University of Wisconsin, Madison.

The basal BHI broth was used as proposed medium, added of 10% NaCl and neutral red at 0,01 and/or 0,001% final concentration. This modified medium has presented a good performance to Staphylococcus aureus recovering. About 70% of strains presented more then 100% of recovering, compared to control medium (BHI agar). Furthermore, it was possbile to perform the DNA'se and coagulase tests using the MPN proposed medium. Thus, becoming easier and more practical the enumeration and characterization of Staphylococcus aureus.

# I - INTRODUÇÃO

O método do número mais provável (NMP) tem sido recomendado por pesquisadores e autoridades, como sendo o mais eficiente na enumeração de microorganismos presentes em pequeno número nos produtos alimentares (menor do que 10/g).

Embora não seja tão eficiente como o método padrão de contagem em placa, tem certas vantagens sobre certos tipos de experimentos, como no caso da determinação de bactérias enterotoxigênicas. O meio líquido usado para a determinação do número mais provável pode ser testado para a verificação da presença de toxinas, como por exemplo, das enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. Pode, também, ser utilizado pelos setores de fiscalização para a presença residual de inibidores lábeis, como o $NO_2$ ou certos antibióticos. Esses recursos são comumente empregados nas fazendas como meio de eliminar a flora de contaminação de produtos, como o leite, devido a frequente condição higiênica insatisfatória, empregada durante a manipulação do produto.

Além da efetividade desse método na enumeração de baixas densidades bacterianas, é igualmente eficiente ou mesmo o indicado para a análise de certos produtos alimentares, onde o método de contagem em placa torna-se difícil ou impraticável.

O objetivo do presente trabalho prendeu-se ao fato de, embora o método oficial contenha uma concentração razoavelmente elevada de NaCl, essa quantidade de sal não é suficientemente efetiva para eliminar a maioria dos organismos halotole

rantes.

Além disso, um dos grandes problemas na determinação das enterotoxinas estafilocócicas está em se utilizar um meio adequado ao seu pleno desenvolvimento.

Foram desenvolvidos meios líquidos para que esses inconvenientes sejam minorados, e testados com linhagens de S. aureus, devidamente caracterizadas e tipificadas de acordo com os padrões internacionais.

# II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1. Staphylococcus aureus

### 1.1 - Evolução taxonômica

Em 1878 Robert Koch descreveu pela primeira vez os estafilococos em pus humano. Dois anos depois, Pasteur cultivou o organismo em um meio líquido e, no ano seguinte, Alexander Ogston, na Escócia, demonstrou que esses organismos descritos por Robert Koch eram patogênicos para ratinhos e cobaias, dando-lhes o nome de Staphylococcus (1882). Dois anos mais tarde, Rosenbach conseguiu isolá-los em cultura pura, caracterizando-os em duas espécies: Staphylococcus (pyogenes) aureus e Staphylococcus (pyogenes) albus, que são agora classificados em gêneros separados, dentro da família Micrococcaceae. Julianelli, em 1930, introduziu a primeira classificação dos estafilococos baseada nas diferenças das estruturas antigênicas, e em 1942 Fisk desenvolveu o método da tipificação com bacteriófagos [12].

Evans [14, 15] e Evans & Niven em 1950 [17] recomendaram o estudo do metabolismo anaeróbico do D-manitol como critério importante na diferenciação entre o S. aureus e outros cocos catalase positiva.

Um estudo sobre a taxonomia dos gêneros Micrococcus e Staphylococcus realizado em 1955 por Evans, Bradford e Niven [16], levou os editores da 7a. edição do Manual de Bergey[7]

a fazerem a separação entre os dois gêneros (Micrococcus e Staphylococcus) baseados na fermentação anaeróbica do D-manitol e da glicose, englobando-os na família Micrococcaceae. Na 8a. edição do mesmo manual [8], essa classificação foi mantida sem alterações.

Mossel [34] endossa a eficácia da chave de classificação dada na 7a. edição de Bergey, usando o critério da fermentação do D-manitol, em combinação com o teste da coagulase, para distinguir o S. aureus de outros cocos catalase positiva. Os estafilococos coagulase negativa podem ser facilmente distinguidos dos micrococos pelo teste de tolerância ao oxigênio.

Atualmente tem-se dado muita ênfase às características físico-químicas do S. aureus como meio de classificação. Dentre elas, a produção de coagulase e de nuclease termo-resistentes tem sido consideradas como sendo critérios práticos mais eficientes [6, 11, 19, 28, 29,29a, 48]. Numerosos métodos e técnicas tem aparecido para a realização destes testes.

Recentemente, vários pesquisadores tem apresentado inúmeras sugestões práticas para estabelecer um critério taxonômico mais adequado para a família Micrococcaceae [50, 51], baseadas nas atividades bacteriolíticas padrões dos Staphylococcus.

## 1.2 - Interesse histórico como patógeno humano

O interesse histórico dos estafilococos como patógeno humano foi grandemente evidenciado em 1928 [12], devido a

um trágico acidente ocorrido em Bundaberg (Austrália). De 21 crianças inoculadas com vacina anti-diftérica de um único frasco, mantido à temperatura de ambiente subtropical por vários dias, 16 ficaram doentes dentro de cinco a sete horas com vômito, diarréia, febre alta, apatia, cianose e convulsões. 20 das crianças morreram dentro de dois dias, e a que sobreviveu desenvolveu abscesso estafilocócico no local da injeção. Os resultados dos estudos subsequentes sugeriram que a morte prematura fora devido à toxina elaborada pelo estafilococo cultivado no frasco. Um tipo diferente de toxina estafilocócica, capaz de causar intoxicação alimentar, foi descrita bem mais tarde por Dack e chamada de "enterotoxina".

## 2. Principais Características do S. Aureus

### 2.1 - Morfologia

Os estafilococos são organismos imóveis e não esporulados, variando seu diâmetro de 0,7 a 1,2 micras. Os cocos individuais das linhagens patogênicas tendem a ser ligeiramente menores do que aquele das linhagens não patogênicas. Todos são Gram positivo, mas nas culturas individuais e nas culturas velhas podem tornar-se Gram negativo. O crescimento característico em formas de "cachos de uva", que resulta das divisões irregulares em três direções perpendiculares entre si, é mais notável nos meios sólidos. Nos meios líquidos quase sempre formam cadeias curtas. Embora essa última característica possa ser confundida com a dos estreptococos, a diferenciação não é

normalmente difícil, uma vez que os estafilococos raramente formam cadeias contendo mais do que quatro membros, enquanto que as cadeias dos estreptococos são usualmente mais longas. Formam colônicas circulares e convexas, de superfície lisa ou ligeiramente granulosa com bordos regulares ou as vezes levemente irregulares. A cor dessas colônias apresenta uma série de tonalidades, variando do branco ao alaranjado e limão. A maioria das linhagens patogênicas para o homem forma colônias douradas as quais, em meio agar/sangue, tornam-se circundadas por uma vasta zona clara de hemólise. Além disso, quase todas as raças patogênicas elaboram uma enzima conhecida como "coagulase", que coagula o plasma sanguíneo (humano ou de coelho)[17].

## 2.2 - Metabolismo

Os estafilococos estão entre as mais resistentes de todas as bactérias não esporuladas [12], podendo sobreviver por meses na superfície de um meio com agar selado e conservado a 4°C. A maioria das linhagens é relativamente resistente ao calor, suportando temperaturas de 60°C por meia a uma hora. Embora altamente susceptíveis aos agentes bactericidas de certos corantes básicos, como a violeta genciana, são mais resistentes do que a maioria das bactérias a desinfetantes como cloreto de mercúrio e fenol, mostrando também grande tolerância a certos sais, além do cloreto de sódio, incluindo o cloreto de lítio, telurito de potássio, cianeto de potássio e azida sódica. Via de regra, toleram bem certos antibióticos, notadamente a polimixina e a penicilina.

As linhagens típicas de estafilococos crescem prontamente num meio quimicamente definido contendo 14 aminoácidos , glicose, sais e dois fatores traço de crescimento - tiamina e ácido nicotínico. São facultativamente anaeróbicos, mesófilos, com melhor desenvolvimento em condições aeróbicas à temperaturas variando de 35 a 43°C, com pH entre 7,0 e 7,5 . Nas culturas provenientes de produtos alimentares não submetidos a tratamentos tecnológicos, o peróxido de hidrogênio não se acumula nas condições aeróbicas, porque, ao contrário do que ocorre com o pneumococo, o organismo elabora a catalase. A maioria das linhagens patogênicas fermenta o D-manitol e glicose em condições anaeróbicas, além da produção de pigmento amarelo, hemolisina, coagulase, desoxi-ribonuclease e muitas outras enzimas usadas em sua caracterização. Particularmente, os estafilococos elaboram enzimas lipolíticas que os tornam resistentes aos lipídios bactericidas.

## 2.3 - Toxinas

Desenvolvidos em meios artificiais de composição definida , os estafilococos patogênicos liberam diferentes "exotoxinas". As toxinas comumente elaboradas são a leucocidina hemolítica, a enterotoxina e as hemolisinas (em número de quatro), imunologicamente diferentes. Uma única linhagem pode produzir mais do que um tipo imunológico de hemolisina [12].

A enterotoxina é elaborada apenas por um número limitado de linhagens estafilocócicas, sendo imunologicamente distintas de outras toxinas produzidas por esses organismos. Em-

bora seja uma proteina básica contendo alto teor em lisina, é resistente a tripsina e ao calor.

Cerca de cinco tipos sorologicamente distintas de enterotoxina são atualmente conhecidos (A, B, C, D e E). Há evidência [5] de que a toxina C seja na realidade duas toxinas (C e $C_1$). Esse fato parece ter sido aceito pelo " Food Research Institute" (FRI), que possui na sua coleção uma linhagem de S. aureus classificada como FRI 137 $C_1$.

Os estafilococos são importantes como agentes de intoxicação e de infecções humanas. Há um consenso geral de que as enterotoxinas que causam intoxicação alimentar possam também tomar parte nessas infecções [43]. As intoxicações alimentares por estafilococos constituem um dos três tipos mais comuns de intoxicação alimentar nos Estados Unidos. Aproximadamente 25 % de todas as doenças disseminadas por alimentos notificadas nos E.U.A. são causadas por intoxicações estafilocócidas [6,32]. Esse problema constitui assim um ponto de crucial importância para a saúde pública.

As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas somente por linhagens de S. aureus, podendo algumas delas produzirem mais de um tipo. Tem-se registrado esporadicamente a produção de enterotoxina estafilocócica por outros tipos de cocos; mas com base em recentes estudos, parece que essas linhagens são variantes ou mutantes de S. aureus caracterizadas pela ausência da produção de coagulase [6].

## 2.4 - Enzimas extracelulares

Entre as várias enzimas liberadas pelos estafilococos nos meios artificiais com formulação definida, a maior atenção tem sido dada para a coagulase, desoxi-ribonuclease, e em menor grau, a fosfatase e penicilinase.

Os estafilococos parecem ser das únicas bactérias a produzirem a coagulase e, agindo sobre o plasma humano ou de coelho, determina sua coagulação. A coagulase tem uma ação semelhante a da tromboquinase, coagulando o fibrinogênio purificado em presença do fator de reação da coagulase (Coagulase - reacting factor - CRF) existente no plasma. Esse fator é semelhante a protrombina e existe em maior concentração no plasma de algumas espécies (humano, coelho, cavalo) do que em outras (cobaias, camundongos e ratos). A grande diferença entre a coagulase e a tromboquinase é que, enquanto a primeiras delas requer ions cálcio e fatores V e VII do plasma, a última não as necessita. As coagulases estafilocócicas são antigênicas e sete variedades imunologicamente diferentes já foram identificadas. Todavia, tem sido dado ênfase apenas a dois tipos de real interesse na Microbiologia de Alimentos: a "coagulase livre" , que atua sobre o fibrinogênio em conjunto com outros fatores existentes no plasma (teste em tubos) e a "coagulase conjugada", que atua diretamente sobre o fibrinogênio (pesquisa em lâmina ou placa) [10], também conhecida como "fator de aglutinação" - ("clumping factor"). O fator de aglutinação não é bloqueado pelos anticorpos anti-coagulase e não requer CRF [12].

Tem sido usado na atualidade três métodos para a detecção da coagulase: (a) o teste em tubo; (b) o teste em lâ

mina; e (c) o teste em placa de agar. Apesar das críticas, o teste em tubo é considerado o método mais exato para a detecção da coagulase[47,48] e assim usado rotineiramente para a identificação do S. aureus [8, 13, 23a, 46] . Os aperfeiçoamentos nos métodos de agar em placa para a detecção de coagulase , desde sua introdução em 1944, tem levado a formulação de meios das mais variadas credibilidades.

Investigações das mais diversificadas tem sido feitas no sentido de relacionar a presença da coagulase, desoxiribonuclease, fator de aglutinação e fosfatase do estafilococo com seu poder patogênico [18, 27, 29, 30, 33 e 42]; todavia , não há um consenso geral entre os pesquisadores quanto à veracidade dessa relação.

Há dois métodos principais para a determinação da atividade de nuclease do estafilococo: o método em lâmina [11, 29,29a,30] e método em placa [6, 25, 27], além do método turbidimétrico em tubo [18].

## 3. O Número Mais Provável (NMP)

### 3.1 - Fundamento teórico e matemático

As primeiras referências sobre o cálculo do número de microorganismos feito através dos tubos de fermentação , datam de 1908, onde Phelps [41] apresenta um método para a determinação do Bacillus coli (Escherichia coli) segundo o princípio dos tubos múltiplos. Sugeriu nesse trabalho que o número

de E. Coli nas amostras de água deveria ser expressa como a recíproca da menor porção da amostra em uma série geométrica das diluições que desse um resultado positivo. Este método assume que as diluições das amostras devem ser tais que as menores diluições finais devem dar resultados negativos. O método torna se confuso quando ocorrem falhas na sequência das diluições e quando mais do que uma observação é obtida de uma determinada amostra.

Mc Crady [37] foi o primeiro pesquisador a discutir em profundidade a interpretação numérica dos resultados dos tubos de fermentação, não só em termos numéricos, mas também em termos de precisão. De fato, as tabelas de número mais provável (NMP) desenvolvidas por ele ainda estão em uso. Mc Crady também enfatizou a necessidade de se usar muitos tubos , como 10 por diluição por exemplo, para se obter um resultado preciso. Desde o último trabalho de Mc Crady, inúmeros autores tem tentado modificar esse embaraçoso método de estimativa da densidade bacteriana. A grande maioria deles enfatizando a necessidade de serem utilizados o maior número possível de tubos por diluição, a fim de que se obtenha resultados mais exatos.

Halvorson e Ziegler [21] apresentaram considerações matemáticas para o método dos tubos de diluição visando a estimativa das populações bacterianas. Desenvolveram também equações que poderiam ser usadas na avaliação do NMP de organismos a partir do número de tubos que não apresentavam qualquer crescimento, seja quando uma série de tubos era inoculada com uma diluição única, seja quando várias séries de tubos eram inoculadas com mais de uma diluição. Todavia, nesse trabalho, os

autores não fizeram considerações sobre os fatores que determinavam a exatidão dos resultados.

No trabalho seguinte [22], procuraram então considerar a exatidão dos dados obtidos usando uma série de tubos inoculados com uma única diluição. Foi sugerido nesse trabalho que, em se usando uma diluição única, a exatidão dos resultados dependia não apenas do número de tubos inoculados, mas também da população bacteriana.

No caso de uma diluição única, na qual são utilizados vários tubos, é possível, segundo Halvorson, ser avaliada a distribuição da frequência a partir da qual são calculados o desvio padrão e o coeficiente de variação. Todavia, não é possível o estabelecimento definitivo da exatidão sem o prévio conhecimento da população bacteriana, porque essa exatidão depende, conforme já assinalado, não apenas do número de tubos usados, mas também da população bacteriana. Esta limitação pode ser superada em parte pela utilização de muitas diluições.

Para o cálculo do NMP, usando uma série de três diluições, Halvorson e Ziegler [23] concluiram matematicamente , que a exatidão dos resultados não dependia da população bacteriana, mas sim do número de tubos por diluição. Isto é, a probabilidade de uma determinação mais exata da densidade bacteriana aumentava proporcionalmente com o número de tubos por diluição.

Para comprovar as considerações teóricas anteriormente apresentadas com os dados experimentais, Halvorson e Ziegler [53] compararam o crescimento das populações bacterianas pelos métodos do NMP, da contagem em placa e a contagem dire-

ta. Encontraram que, em regra geral, o método do NMP dá valores maiores do que o método de contagem em placa. O método da contagem direta apresenta o mesmo valor que o método da contagem em placa e do NMP, quando as culturas são usandas antes de entrarem em fase de morte, indicando que a viabilidade é uma outra variável que deve ser levada em consideração quando se pretende avaliar a densidade bacteriana.

Mc Carthy et al. (31) demonstraram um desvio matemático substancial nos valores do NMP comparada a contagem em placas. Talvez Woodward (52) tenha concluido melhor essa asserti va: "a carência de precisão das estimativas das densidades bacterianas pelo NMP é geralmente reconhecida - pelos menos para aqueles que lidam com essa técnica". No mesmo trabalho, Woodward publicou tabelas dos limites de confiança para três e cinco tubos de diluições múltiplas.

A mais recente revisão sobre o método do NMP foi realizada por Cochran em 1950 (9). Sua revisão não entra na derivação de todas as equações, mas estabelece as suposições que devem ser levadas em consideração quando se usa o método da diluição (NMP).

Parnow (38) propôs que se determinase a estimativa da densidade bacteriana pelo NMP, utilizando um programa de computador. O trabalho não mostra a derivação das equações usadas no programa de computação do NMP, mas apresenta algumas teorias básicas usadas para derivar essas equações. Estabelece também as suposições que devem ser levadas em conta e como usar as informações sobre o NMP e seus erros padrões, para planificar testes adicionais em um determinado produto.

A vantagem mais importante do programa do NMP é que uma estimativa da população pode ser feita por qualquer número dos níveis de diluição, qualquer combinação dos números de tubos por nível de diluição e qualquer volume de amostra em cada tubo. Esta vantagem torna-se mais evidente quando alguns tubos são acidentalmente quebrados ou se o crescimento em alguns deles é tal que se torne aconselhável excluí-los do ensaio.

Uma outra vantagem importante do programa é que, embora não apresente o cálculo dos limites exatos de confiança, não obstante, fornece o erro exato da estimativa e uma boa aproximação do que pode ser o intervalo da densidade verdadeira. As tabelas da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) fornecem apenas a estimativa da população e não uma indicação da exatidão. Parece razoável acreditar que essas tabelas deveriam ser suplementadas com o erro padrão e os limites de confiança, entre os quais deveria se situar a densidade verdadeira que, sendo muito ampla, poderá tornar-se um fator crucial em alguns ensaios.

Na aplicação das equações que tem sido desenvolvidas, há duas suposições que devem ser levadas em consideração: (a) os organismos estão distribuidos ao acaso na extensão da amostra líquida. Isto significa que a probabilidade de um organismo ser encontrado em qualquer volume do líquido é igual à probabilidade de que um organismo possa ser encontrado em qualquer outro volume do líquido. E, também, que não haja tendência para que grupos de organismos se atraiam mutuamente ou se repilam; (b) se uma amostra é incubada em tubos de diluição, essa amostra também deverá apresentar crescimento, se um ou mais or

ganismos estiver presente. Se uma amostra não apresentar crescimento é suposto que nenhum organismo está na amostra.

Se um volume líquido de M ml contém um organismo, a probabilidade de que estará presente numa amostra de V ml retirada do líquido é dada pela relação entre o volume da amostra e o volume do líquido, V/M. A probabilidade da ausência do microorganismo na amostra será dada por:

$$(1 - \frac{V}{M})$$

Se houver b organismos no volume M, a probabilidade de que nenhum deles está na amostra será obtido pela regra do produto da probabilidade,

$$p = (1 - \frac{V}{M})^{b} \qquad (1)$$

Quando,

$$M \longrightarrow \infty \quad e \quad \frac{V}{M} \longrightarrow 0 \ ,$$

a equação torna-se,

$$p = e^{-Vb/M} \qquad (2)$$

Sendo a razão V/M geralmente muito pequena, a equação pode ser escrita,

$$p = e^{-V\sigma} \qquad (3)$$

considerando-se a densidade "$\sigma$" do microorganismo como sendo b/M.

Quando se considera uma única diluição de N amostras tomada do volume V, a proporção das amostras estéreis para o

número total de tubos, S/N, é uma estimativa da probabilidade, p . Substituindo-se S/N por p, na equação (3), teremos uma equação para a estimativa d da densidade $\delta$ :

$$S/N = e^{-Vd} \qquad (4)$$

onde:

p = probabilidade de que nenhum organismo está presente na amostra.

V = volume da amostra

M = volume total do líquido

b = número de organismos no volume M

$\delta$ = densidade do organismo

d = densidade estimada do organismo

N = número total de tubos

S = número de tubos estéreis

Quando se utiliza mais do que uma diluição, a equação torna-se muito complexa e os detalhes das derivações podem ser encontrados nos trabalhos de Halvorson e Ziegler [23].

O estabelecimento das equações fundamentais para o uso de várias diluições foi feito por Cochran [9]:

$$\sum_{i=1}^{N} \sum_{x=1}^{\infty} e^{-Vid} \times piqi^{x-1} = \frac{\sum_{i=1}^{N} pi\, e^{-Vid}}{1 - qi\, e^{-Vid}} \qquad (5)$$

onde:

pi = (Ni - Si) Vi = tubos não estéreis vs. volume da amostra na iésima diluição.

pi = probabilidade do tubo ser estéril da iésima diluição.

qi = probabilidade do tubo conter microorganismo na iésima diluição.

x = número de tubos.

p(x) = probabilidade de ter x número de tubos contendo microorganismos.

Assim,

$$p(x) = p \cdot q^{x-1}$$

Para q próximo a 1 e p muito pequeno, teremos:

$$\sum_i SiVi = \sum_i \frac{(Ni - Si)\ Vi\ e^{-Vid}}{1 - e^{-Vid}} \qquad (6)$$

onde:

i = índice da diluição.

Si = número de tubos estéreis na iésima diluição.

Vi = volume da amostra na iésima diluição.

Ni = número total de tubos na iésima diluição.

d = estimativa da densidade da população.

$\sum_i SiVi$ = volume da amostra estéril.

A equação (6) foi ligeiramente alterada a fim de ser adaptada aos programas de computação. Esta alteração deveu-se ao fato de o número de tubos estéreis, S, ser igual a diferença entre o número total de tubos, N, e o número de tubos estéreis, P; tendo-se finalmente a seguinte equação:

$$\sum_i (Ni - Pi)Vi = \sum_i \frac{Pi\ Vi\ e^{-Vid}}{1 - e^{-Vid}} \qquad (7)$$

Além dessas equações, outras foram desenvolvidas para o cálculo do "erro padrão" e cálculo do "limite de confiança"; sendo este calculado através da distribuição da "frequên-

cia de probabilidade" de qualquer combinação dos tubos positivos e negativos para um dado ensaio (Halvorson e Ziegler, 1933).

## 3.2 - Suposições básicas para o método do NMP

O número mais provável (NMP) é, fundamentalmente, o número que representa uma estimativa da densidade dos microorganismos viáveis presentes em uma determinada amostra de substrato. De maneira a aplicar a teoria da probabilidade, devem ser feitas e assumidas certas suposições básicas [19]:

a) Assume-se que os organismos estão distribuidos aleatoriamente através do meio;

b) Que há igual probabilidade de ser encontrado um microorganismo tanto em uma porção do meio como em outra;

c) Que os organismos existem como entidades isoladas, não em grupos ou aglomerados;

d) Que não se repelem entre si;

e) Cada porção da amostra, quando incubada com o meio de cultura, deverá exibir crescimento, desde que o inóculo contenha um ou mais microorganismos viáveis; e

f) Que o analista sempre selecione os nutrientes apropriados e as condições fisiológicas adequadas para assegurar um bom crescimento do organismo em questão.

Os resultados mais exatos são obtidos quando uma série de tubos permite resultados positivos em todos os tubos da diluição mais baixa, e negativos na diluição mais alta. As téc

nicas mais comuns são aquelas que empregam três ou cinco tubos por diluição múltipla de 10 . Os limites de confiança para um número mais provável vão se estreitando, a proporção que o número de tubos inoculados para cada diluição aumenta.

### 3.3 - Aplicações do método do NMP

Como todo método empírico, o do NMP apresenta algumas limitações e, porisso mesmo, não é tão preciso como o método do padrão de contagem em placa (embora também seja um método empírico), quando se trata da enumeração de organismos com alta densidade em uma amostra de alimento. Tendo em vista a natureza aleatória do método, deve ser levado em conta que o valor do "número mais provável" nada mais é do que uma estimativa da população e não uma enumeração precisa dos organismos viáveis. Todavia, quando convenientemente empregado, apresenta vantagens de múltipla utilidade, especialmente em situações onde o método da contagem em placa não é conveniente ou mesmo impraticável [37]. Dentre elas estão: (a) podem ser feitas estimativas das populações microbianas usando qualquer número de diluições - semelhante ao método da contagem em placa; (b) a exatidão pode ser ajustada aumentando-se o número de tubos por diluição; (c) o tamanho da amostra pode ser bastante grande ; (d) a sensibilidade e a recuperação pelo método do NMP é geralmente melhor para os níveis populacionais baixos - menor do que 10 por grama - do que pela contagem em placa. Isto se deve ao fato de se poder usar maiores volumes da amostra, o que não ocorre com a contagem em placa; (e) a recuperação pode ser melhor nos meios líquidos do que nos meios sólidos, dependendo

da amostra particular envolvida [21].

### 3.4 - Utilização dos dados para a estimativa do NMP

Para o emprego dos dados obtidos nos experimentos do NMP, são utilizadas tabelas especialmente preparadas para esse fim [2, 3, 19, 46].

Assumindo-se que os números tabulados para o cálculo do NMP estão corretamente computados, sem que haja necessidade de serem efetuadas as deduções exaustivas das equações matemáticas correspondentes, o passo seguinte será o da apreciação dos intervalos de confiança que acompanham essas tabelas[2, 19]. Os limites de confiança para as estimativas do NMP são computados com base na distribuição logarítmica normal. Como a estimativa do NMP é aleatória, esses limites de confiança não são simétricos com o estimado do NMP.

Deve ser levado em conta que a precisão do teste com tubos de fermentação é geralmente baixa, a menos que seja examinada uma grande porção da amostra [2]. Mesmo que a amostra contenha um organismo por ml, cerca de 37% dos tubos de 1,0 ml poderá apresentar resultados negativos, por causa da distribuição irregular das bactérias na amostra. Quando cinco tubos, contendo cada um 5,0 ml da amostra, são empregados nas mesmas condições, espera-se um resultado completamente negativo em menos do que 1,0 %.

Como regra geral para o emprego de três tubos por diluição, mesmo utilizando-se mais do que três diluições seriadas, os resultados que serão computados nas tabelas devem refe

rir-se apenas a três desse tubos. O procedimento é o seguinte [19, 37]: (a) selecionar a diluição mais alta em que todos os três tubos apresentaram resultados positivos e a seguir as próximas duas diluições mais altas (ex.: a, b, c, d, e, f). Quando uma diluição apresentar um resultado positivo que seja maior do que os três tubos selecionados de acordo com a regra, essa deverá ser adicionada ao resultado para a escolha da diluição mais alta (ex.: g, h); (b) se forem feitas mais do que três diluições e nenhuma delas apresentar três tubos positivos, usar os dados que incorpore os tubos positivos presentes (ex.: i); (c) nos casos em que o número de microorganismo é muito baixo (ex.: j), incorporar o resultado positivo de tal modo que represente a diluição média, se possível.

Exemplo de determinação do estimado do NMP

| | Diluições das amostras | | | | | Combinação dos tubos positivos | NMP por g ou ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | | |
| a | 3/3* | 2/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 3-2-0 | 93 |
| b | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 0/3 | 3-1-0 | 4300 |
| c | 3/3 | 2/3 | 2/2 | 0/3 | 0/3 | 3-2-2 | 210 |
| d | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 1/3 | 0/3 | 3-0-1 | 390 |
| e | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3-3-3 | ( $11 \times 10^4$) |
| f | 3/3 | 0/3 | 1/3 | 0/3 | 0/3 | 3-0-1 | 39 |
| g | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 1/3 | 0/3 | 3-2-2 | 210 |
| h | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 2/3 | 1/3 | 3-2-3 | 2900 |
| i | 2/3 | 2/3 | 2/3 | 2/3 | 0/3 | 2-2-2 | 350 |
| j | 0/3 | 1/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0-1-0 | 3 |

$$(*)\ \frac{\text{Numerador}}{\text{Denominador}} = \frac{\text{Número de tubos positivos}}{\text{Número de tubos inoculados}}$$

## 3.5 - Modificações técnicas do método do NMP

Como já assinalado anteriormente, o método do NMP é amplamente utilizado para as mais diversas finalidades, visando a estimativa da população bacteriana de um dado substrato. Dessa maneira, várias modificações técnicas tem sido feitas no sentido de adaptá-lo a casos particulares [44]. Como é o caso da determinação de populações amônio-oxidantes em amostras de solo. Essa microtécnica provou maior sensibilidade do que o método tradicional do NMP, devido a melhor exatidão dos resultados obtidos nas diluições finais, além de menor dispêndio de tempo, espaço, equipamentos e reagentes.

Alexander [1] adaptou o método do NMP para a determinação da contagem microbiana total de amostras de solo, incluindo uma tabela específica de número mais provável.

Outra modificação importante realizada no método padrão foi idealizada por Munoz e Silverman [35] para a enumeração de coliformes fecais dos efluentes das instalações de tratamento de esgoto. Esse método requer apenas um meio de cultura e uma temperatura de incubação. As contagens obtidas foram comparáveis com as realizadas pelo procedimento padrão do NMP.

# III - MATERIAL E MÉTODOS

## 1. Linhagens usadas nos ensaios

### 1.1 - Staphylococcus aureus

As linhagens de Staphylococcus aureus utilizadas neste trabalho foram da coleção do "Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas", dentre as quais algumas provenientes do "Food Research Institute" (FRI).

### 1.2 - Micrococcus glutamicus

A linhagem de Micrococcus glutamicus foi cedida pelo "Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas", proveniente do "United States Department of Agriculture" (USDA).

## 2. Tipificação das linhagens de Staphylococcus aureus

A tipificação das linhagens foi realizada pelo Laboratório do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, por especial deferência do Prof. Dr. Carlos Solé Vernin.

## 3. Ensaios Preliminares

### 3.1 - Linhagem de ensaio

Para os ensaios preliminares foi utilizada a linhagem S 50 (Staphylococcus aureus, fagótipos: 53/54/84/85/95).

### 3.2 - Meios de cultura

A linhagem de Staphylococcus aureus S 50 foi ensaiada com diferentes meios de cultura, procedendo as alterações necessárias nos constituintes desses meios e verificando as reações do microorganismo.

Foram utilizados, na fase preliminar, os seguintes meios: TSB (Trypticase Soy Broth), MSB (Mannitol Salt Broth), ambos com adição de 10% de NaCl e 0,002% de azul de bromotimol e pH final ajustado a 7,0.

Posteriormente foi utilizado, além do TSB e MSB, o meio BHI (Brain Heart Infusion). Nesses meios, foram adicionados NaCl nas concentrações de 7,5 ; 8,0 ; 9,0 e 10%. O indicador usado foi o vermelho fenol a 0,0025% e o pH ajustado a 7,4.

## 4. Ensaios Definitivos

### 4.1 - Linhagens de ensaio

Para os ensaios definitivos, após a escolha apropriada dos meios e reagentes, foram utilizadas as linhagens devida

mente tipificadas constantes do Quadro II .

## 4.2 - Caracterização dos meios e reagentes

a) BHI Agar (BHIA)

b) BHI Caldo (BHIB)

c) BHI Caldo + 10% de NaCl + vermelho neutro 0,01 e 0,001% (BHISVN)

d) TSB Caldo + 10% de NaCl (TSBS)

e) Água peptonada a 0,1%

f) TDA (Toluidin Blue O-DNA-Agar)

g) Plasma liofilizado de coelho - EDTA

## 4.3 - Preparo dos meios e reagentes

a) BHI Agar da BBL - preparado de acordo com as instruções do fabricante.

b) BHI Caldo da BBL - preparado de acordo com as instruções do fabricante.

c) BHI Caldo + 10% de NaCl + vermelho neutro a 0,01 e 0,001% respectivamente.

d) Solução estoque de vermelho neutro a 1% - esta solução estoque de VN foi preparada em solução aquosa, adicionando-se 1,0 g do corante e completando-se o volume para 100 ml com água destilada em balão volumétrico. A solução assim preparada, foi mantida em frasco "ambar" à temperatura de refrigeração. Para uso no BHI mod. (c),

foi adicionado, ou 1,0 ml ou 10,0 ml para cada litro do meio antes da aferição do pH.

e) Cloreto de sódio - adicionado ao meio base (BHI) na proporção de 9,5% , tendo em vista que o referido meio já contém 0,5% deste sal.

f) TSB Caldo + 10% de NaCl - preparado pela adição de 9,5% de sal, pelas mesmas razões do caso anterior.

g) Água peptonada a 0,1% - preparada pela dissolução de 1,0 g de peptona bacteriológica (Difco) para cada litro de água destilada.

h) Plasma liofilizado de coelho - EDTA : reconstituído de acordo com as instruções do fabricante.

i) TDA - preparado da seguinte maneira [29a]:

"para 1000 ml de uma solução 0,05 M de tampão Tris (hidroximetilaminometano), pH 9,0 , foi adicionado 0,3g de DNA (Difco), 10,0 g de agar (granulado da Difco), 1,0 ml de $CaCl_2$ 0,01 M, 10,0 g de NaCl e 3,0 ml de azul de toluidina 0,1 M";

Antes da adição da solução de azul de toluidina, a mistura acima foi aquecida até a fusão completa do DNA e do Agar. A seguir, a mistura foi dispensada em pequenos volumes e estocada à temperatura de refrigeração.

j) Litmus Milk - preparado de acordo com as instruções do fabricante.

OBS.: Os meios usados no método do número mais provável, no método da contagem em placa, diluentes ( água peptonada a 0,1%), de manutenção para os ensaios

(BHI inclinado) e para a reativação das culturas (BHI caldo), foram aferidos a um pH 7,4 ± 0,1 .

## 4.4 - Especificação dos equipamentos e outros

a) pHâmetro do tipo digital (Expanded Scale pH meter - Corning Digital 110).

b) Espectrofotômetro - "Spectronic 20" da Bausch & Lomb.

c) Agitador de tubos - "Cyclo-Mixer Clay Adams" (Beckton , Dickson and Company).

d) Pipetador e dispensador (envasador) automático "Brand Dispenser" (Laborgeräte D-6980 Wertheim).

e) Contador de colônicas - "Erma Optical Works, Ltd.".

f) Balança - "Mettler P 1200 N" (Mettler, 8606 Greifensee-Zurich, Schweiz).

g) Microscópio - "Zeiss", modelo Standard.

h) Incubadores providos de termostato, regulados para 10, 37 e 55°C - Tipo "Walk-in", da FANEM.

## 4.5 - Recuperação das culturas estocadas a -20°C

### 4.5.1 - Reativação

As culturas estocadas em "Litmus Milk", após prévia incubação a 37°C por 24 horas, foram transferidas com auxílio de alça de platina para o meio BHI caldo. A seguir foram incubadas por 24 horas a 37°C.

4.5.2 - Verificação da pureza

As culturas de 24 horas do meio BHI caldo foram semeadas por esgotamento na superfície seca das placas de BHI agar e incubadas por 24 horas a 37°C . Tomando-se as colônias típicas desenvolvidas no meio agar, foram elaborados esfregaços e realizadas coloração pelo método de Gram. Não se fez necessário outros testes complementares nessa etapa, por se tratar de culturas supostamente puras. Constatada a pureza, foram então repicadas em BHI agar inclinado e reincubadas a 37°C por 18 a 24 horas. As culturas assim obtidas foram estocadas* em estufa refrigerada ("walk-in" da FANEM) a mais ou menos 10°C, vindo a constituir a "amostra de partida" para os ensaios subsequentes.

4.6 - Preparo do inóculo

4.6.1 - Semeadura em BHI caldo

A "amostra de partida", correspondente a linhagem em estudo, foi repicada em meio BHI caldo recentemente preparado e a seguir incubada a 37°C por 18 horas (sem agitação). Após esse período, nova repicagem foi realizada para o meio BHI caldo e a cultura reincubada sem agitação, como no caso anterior, por cerca de seis horas a 37°C.

---

(*) As culturas estocadas foram devidamente acondicionadas em tubos de vidro (90 x 10 mm), e providos com tampão de algodão hidrófilo selados com "parafilme".

4.6.2 - Padronização da densidade bacteriana

Feita através do método turbidimétrico, utilizando-se o espectrofotômetro "Spectronic 20" de Bausch & Lomb, calibrado para 600 nm e adaptado para operar com tubos especiais de 20 mm de diâmetro (tubos em "L").

A densidade ótica para todas as culturas ensaiadas foi padronizada para 0,50 e o procedimento adotado foi como segue:

a) Foram pipetados cerca de 3,0 ml da cultura reativada de 6 horas (4.6.1) e transferidos para o tubo "L" anteriormente mencionado, contendo cerca de 12,0 ml de BHI caldo recentemente preparado e estéril. Foram tomadas todas as precauções necessárias nessa fase e nas demais a fim de ser minimizada a contaminação fortuita.

b) Calibrado o espectrofotômetro com o padrão branco (tubo em "L" com 15,0 ml de BHI caldo sem inóculo), foi procedida a determinação da densidade óptica da amostra. Como diluente para o acerto da densidade óptica foi utilizado o meio BHI caldo devidamente esterilizado.

c) Imediatamente após a determinação da D.O. o,50, a amostra foi acondicionada em recipiente contendo gelo picado para impedir a multiplicação do organismo nessa fase.

## 4.7 - Preparo das diluições e inoculações dos meios

Após vários ensaios realizados no sentido de ser determinada a faixa de diluição que satisfizesse as condições de trabalho, ou seja, que fosse concorde com a metodologia oficialmente aceita para a determinação do número mais provável(NMP) e da contagem em placa [2, 46], concluiu-se pelas diluições $10^{-6}$ a $10^{-9}$. Essas diluições satisfizeram plenamente os critérios estabelecidos, partindo-se de cultura com D.O. 0,50.

### 4.7.1 - Diluições

Foi transferida uma alíquota de 5,0 ml da amostra em estudo (D.O. 0,50) mantida no tubo em "L" sob refrigeração - (4.6.2 c.), para um frasco erlenmeyer contendo 45,0 ml de água peptonada a 0,1% (Figura I) - diluição $10^{-1}$. A partir dessa primeira diluição, foram preparadas diluições sucessivas da seguinte maneira: Após agitar vigorosamente o frasco erlenmeyer contendo a primeira diluição (para uma perfeita distribuição dos organismos por toda a extensão do meio) foi retirada uma alíquota (com pipeta estéril de 5,0 ml) de 4,0 ml e transferida assepticamente para o primeiro tubo (195 x 25 mm) da série, contendo 36,0 ml de água peptonada a 0,1%. Procedimento idêntico foi adotado para os demais tubos, até que fosse atingida a diluição $10^{-9}$. Antes de ser efetuada a diluição seguinte, a anterior era completamente homogenizada por agitação (Cyclo-Mixer da Clay Adams).

4.7.2 - Inoculação dos meios

A partir da diluição $10^{-6}$ e tão logo concluída a diluição seguinte, a anterior era inoculada simultaneamente nos meios BHISVN, TSB e BHI agar, respectivamente, conforme mostra a Figura I. Concluídas as inoculações nos meios respectivos, as baterias de tubos e as placas (em triplicata) eram incubadas a 37°C e as leituras e contagens efetuadas em 24, 36 e 48 horas. Como controle de esterilidade dos meios, cada bateria se fazia acompanhar de outra contendo os meios em estudo, porém sem o inóculo (2).

4.8 - Provas complementares

4.8.1 - Teste da coagulase

A produção de coagulase foi determinada, de um modo geral, a partir de uma cultura de 24 horas desenvolvida nos meios BHISVN e TSB, respectivamente. Foi utilizado plasma de coelho liofilizado (Difco), reconstituído com 3,0 ml de água destilada e distribuido em tubos pequenos (10 mm de diâmetro) em alíquotas de 0,5 ml. A cada tubo com plasma foi adicionado - 0,5 ml de cultura e a seguir incubados a 37°C em estufa a ar, sempre acompanhados de um controle sem inóculo. As leituras foram feitas dentro de 2, 4, 12 e 24 horas e os resultados determinados, basicamente, segundo os critérios de Turner e Schwartz (49), porém com escala de coagulação variando de zero a três (0 - $3^+$): (a) coagulação negativa (zero) - quando o meio permanecia completamente líquido, sem qualquer sinal de coagu-

lação; (b) coagulação um ($1^+$), para qualquer sinal evidente de coagulação; (c) coagulação dois ($2^+$) - coágulo perfeitamente evidenciado, porém de consistência frouxa e mantendo a superfície superior líquida; (d) coagulação três ($3^+$) - coágulo consistente e firme, não se deixando deslocar ao ser invertido o tubo.

### 4.8.2 - Teste da DNA'se (desoxi-ribonuclease)

O teste da DNA'se foi realizado de acordo com o método proposto por Lachica et al. [29a]. Este método se baseia na propriedade metacromática da O-toluidina (TBO) azul, que passa de uma coloração azul inicial a uma tonalidade rósea brilhante, após a hidrólise do DNA pelo microorganismo (Fig. II).

O meio TDA previamente preparado (4.3-i)) e fundido (não sendo necessário sua esterilização), foi a seguir distribuido uniformemente com pipeta de 5,0 ml na superfície plana das lâminas de microscópio, na alíquota de 3,0 ml. Após a solidificação do meio à temperatura ambiente, as lâminas contendo o meio foram perfuradas com orifícios de 2 mm de diâmetro, dispostos em dupla fileira e distanciados por cerca de 1,0 cm dos orifícios adjacentes.

Preparadas as lâminas, os orifícios foram inoculados com as culturas dos meios respectivos por meio de pipeta de Pasteur. Nos orifícios superiores foram inoculadas as culturas aquecidas (ebulição por 15 minutos) e nos inferiores as culturas não aquecidas, para a determinação das atividades termodúrica e termolábil das nucleases, respectivamente (Fig. II).

As lâminas contendo o meio (TDA) eram preparadas com quatro a cinco pares de orifícios. Um par de orifício servia como controle de esterilidade (ou de contaminação). Um deles era inoculado com o meio do teste (BHISVN ou TSBS) sem inóculo e o outro mantido sem qualquer adição, seja de inóculo ou de meio da prova.

Após incubação a 37°C, eram procedidas as leituras em 2, 4, 12 e 24 horas.

A atividade nucleásica (termoestável e termolábil), nesse meio, é reconhecida pelo aparecimento de uma zona rósea brilhante (halo de hidrólise do DNA), discernível após 2 a 4 horas de incubação a 37°C (Fig. II).

Os critérios utilizados para a quantificação dos resultados em termos comparativos foram os seguintes: 1) aferição (em mm) das zonas metacromáticas com régua apropriada; 2) enquadramento dessas medidas em uma escala de valores. Assim, para os halos de hidrólise medindo 1,0 mm de diâmetro: grau $1^+$; para os halos de 2 mm de diâmetro: grau $2^+$; e, para os halos com medida superior a 3 mm de diâmetro: grau $3^+$.

# IV - RESULTADOS

## 1. Formulação dos Meios

Os ensaios preliminares realizados com azul de bromotimol (limites de viragem entre 6,0 - 7,6) e vermelho fenol (limites de viragem entre 6,8 - 8,4), não apresentaram bom resultado nos meios de ensaio.

No caso do azul do bromotimo, a mudança do pH inicial do meio (pH 7,0) só foi detectada quando em presença de alta densidade bacteriana (diluição $10^{-1}$), com a cultura padronizada à D.O, 0,30 . Fato semelhante ocorreu quando este indicador foi substituído pelo vermelho fenol, nos meios MSA, TSB e BHI, respectivamente, nas diferentes concentrações de cloreto de sódio.

Nesses meios com pH inicial 7,4 , as variações de viragem do indicador não foram significativas: para as diluições $10^{-1}$, o pH baixou em média para 6,0 ; 6,4 para as diluições $10^{-2}$ e 7,1 para as diluições $10^{-3}$ . A viragem do indicador só foi bem evidenciada para as diluições $10^{-1}$ (em relação as demais), enquanto que as diluições $10^{-2}$ só apresentaram viragem na superfície dos meios respectivos.

O meio finalmente adotado para os ensaios subsequentes foi o BHI, adicionado de NaCl na concentração final de 10% e o indicador vermelho neutro a uma concentração final de 0,01 ou 0,001 % .

## 2. Caracterização das Linhagens de S. aureus e Micrococcus

Das 43 linhagens de S. aureus utilizadas neste trabalho, 38 foram devidamente caracterizadas pelos métodos convencionais de laboratório e tipificadas segundo os padrões internacionais. Foram utilizados os fagótipos do tipo "1 x RTD" e "100 x RTD", respectivamente (Quadros I, II e III). As 08 linhagens restantes foram provenientes do "Food Research Institute" (FRI).

Exceto as linhagens de Staphylococcus S 50-18 e S 50-39, caracterizadas como coagulase e DNA'se negativos (45), todas as demais deram resultados positivos para esses testes.

Linhagens toxigênicas empregadas:

(1) - S 6 (FRI): toxinas A e B

(2) - S 89, S 113 e S 113-1 (coleção do Laboratório): toxina C.

(3) - S 100 (FRI): toxina A

(4) - S 137 (FRI): toxina $C_1$

(5) - S 326 (FRI): toxina E

(6) - S 472 (FRI): toxina D

## 3. Dados Comparativos da Recuperação nos dois meios

### 3.1 - Staphylococcus

O meio de Baird & Parker recomendado por inúmeros autores (4, 24, 26 e 32) como um dos meios mais apropriados para a enumeração de Staphylococcus, especialmente quando esses

organismos sofreram qualquer injúria, como aqueles provenientes de alimentos processados, tais como: congelados, desidratados, secos, pasteurizados e irradiados. Neste trabalho, contudo, foi empregado o meio BHI agar da BBL como controle de recuperação dos organismos nos meios em estudo, por se tratar de culturas não submetidas a esse tipo de tratamento.

As culturas congeladas a -20°C, após a reabilitação em BHI por 24 horas, foram novamente inoculadas em BHI e reincubadas por mais seis horas a 37°C sem agitação. Este curto período de reincubação adicional foi necessário, não só para prover um inóculo denso e ativo (fase exponencial) como também para acelerar a formação das enzimas, notadamente a coagulase e DNA'se.

Utilizando basicamente a metodologia oficialmente aceita para a determinação do NMP [2, 3, 19, 23a, 46], a diluição $10^{-1}$ foi elaborada para fornecer uma amostra representativa para os ensaios (Fig. I).

Foram feitas três análises para cada linhagem, e as placas de controle em triplicata no meio BHI agar.

Os dados apresentados nas Tabelas I e Ia, respectivamente, representam as médias aritméticas das contagens em BHI agar e dos números mais prováveis nos meios proposto (BHISVN) e no meio oficial (TSBS), para os três testes de cada linhagem.

A partir desses dados, foram calculadas as percentagens médias de cada linhagem em relação ao valor médio das contagens no meio de recuperação (Tabela II).

Para o meio proposto (BHISVN), as contagens do NMP variaram (para as 48 horas de incubação) de 21 a 244% em relação ao meio de recuperação. Enquanto para o meio oficial, a variação foi de 11 a 244%; à excessão das linhagens S 50, S 65, S 68, S 85 e S 100 (FRI), que apresentaram um percentual baixo de recuperação (em média 2,8%).

Cerca de 69% das linhagens ensaiadas no meio proposto apresentaram um valor de recuperação superior a 100% em relação ao BHI agar. O meio oficial apresentou, nas mesmas condições, um percentual de 35,5% .

As linhagens S 6, S 137, S 326 e S 472 (todas do FRI) foram as que apresentaram o maior percentual de recuperação entre as linhagens toxigênicas dos ensaios, com valores de recuperação superiores a 100% no meio proposto. No meio oficial, três delas apresentaram valores iguais a esse: as linhagens S6, S 113-1 e S 137, idem do FRI.

Os testes de coagulase e DNA'se foram realizados com 20 linhagens de Staphylococcus (Tabelas III e IV) das 43 usadas nos ensaios de NMP. Essas amostras foram escolhidas ao acaso, não obedecendo qualquer critério pré-estabelecido; apenas incluindo nelas as linhagens S 50-18 e S 50-39, caracterizadas [45] como coagulase e DNA'se negativa.

Conforme mostra a Tabela III, todas as linhagens testadas para essas provas reagiram positivamente aos testes da coagulase dentro de quatro horas, à excessão das duas linhagens anteriormente mencionadas. A linhagem S 50-39 somente deu resultado positivo para a prova da coagulase após 24 horas (Tabela IV), como já era de se esperar. Essas duas linhagens, e

em particular a S 50-18, foram tomadas como controle negativo das provas nos meios de ensaio.

Os testes de DNA'se foram realizados simultaneamente com os da coagulase. Como nesse caso, todas as culturas reagiram satisfatoriamente aos testes da nuclease termo-resistente e termolábil, dentro de duas horas (exceto as linhagens S 50-18 e S 50-39). Dessas duas linhagens consideradas como negativas para esse teste, conforme já anteriormente mencionado, a S 50-39 deu reação positiva em 12 horas, ao passo que a S 50-18 só o apresentou após 24 horas.

Os resultados apresentados até agora para esses dois testes, foram referidos às amostras desenvolvidas a partir de uma cultura de 24 a 36 horas no meio proposto para o NMP.

Foram também testadas nas mesmas condições, as culturas de 24 a 36 horas a partir do meio "oficial", por se tratar também de um meio líquido. Os resultados positivos foram em número bem inferior e menos significativos do que aqueles encontrados com o meio proposto para a determinação simultânea do NMP (BHISVN); especialmente para as leituras de duas horas de incubação. Mesmo para a leitura das 24 horas, a linhagem S 50-18 não apresentou resultado positivo, como no procedimento anterior.

## 3.2 - Micrococcus

O modelo de Micrococcus utilizado para os testes do NMP neste trabalho foi o Micrococcus glutamicus, linhagem USDA B-2698.

Foram realizados ensaios para a determinação do NMP do Micrococcus glutamicus nas mesmas condições daqueles realizados (com a mesma finalidade) para os Staphylococcus.

Esta linhagem, após 48 horas de incubação a 37°C, não apresentou qualquer crescimento, seja no meio proposto seja no meio oficial para Staphylococcus. O meio de controle utilizado (BHI agar) também não foi muito favorável para a recuperação desse microorganismo (Tabela V), quando semeado individualmente.

Quando essa linhagem de micrococo foi misturada com uma cultura pura de S. aureus e testados quanto ao NMP, os resultados foram bem diferentes daqueles encontrados pelo procedimento anterior. O Micrococcus glutamicus e o Staphylococcus 137 $C_1$ (FRI) em cultura mista a 50% apresentaram, à primeira vista, uma recuperação (em relação ao meio de controle) variável entre 63% e 95% para o método proposto e para o método oficial, respectivamente. Por outro lado, o Staphylococcus 472 D (FRI) nas mesmas condições variou em média de 34 a 30% para os dois meios.

Estes resultados, teoricamente, estariam dentro dos valores esperados, devido a seletividade do meio proposto. Contudo, os testes realizados posteriormente, a partir das colônias desenvolvidas no meio de controle, mostraram a presença em sua quase totalidade do Micrococcus. Das 10 colônias tomadas ao acaso das placas de crescimento, 9 delas era de Micrococcus.

Foram tomadas essas duas linhagens de S. aureus para os ensaios com o Micrococcus, por terem apresentado um índice

superior a 100% de recuperação no meio proposto para a determinação do NMP (Tabela II). Considerando que apenas 50% dessas culturas foi inoculado nos dois meios da prova; e considerando ainda o valor médio de recuperação no meio de controle (BHI agar) quando testadas separadamente, os valores de recuperação das culturas mistas foram: (a) - 126% para a linhagem S $137C_1$ e 34% para a S 472E, no meio proposto (48 horas de incubação); (b) - 190% para a linhagem $137C_1$ e 60% para a linhagem 472E no meio oficial. Demonstrando assim,que a linhagem $137C_1$ é mais facilmente recuperável, mesmo em cultura mista, do que a S 472D.

# V - DISCUSSÃO

## 1. Meio Proposto para a Determinação do Número Mais Provável (NMP) de S. aureus.

É bem conhecido o poder bacteriostático e bactericida de certos corantes sobre as bactérias. Com relação aos gêneros Staphylococcus e Micrococcus [20], ambas as espécies são inibidas pelos corantes ácidos e por grande parte dos corantes básicos, porém apresentam menor inibição frente aos corantes neutros.

Os resultados apresentados nesse trabalho, demonstram que o vermelho neutro não tem um efeito inibidor significativo sobre a maioria das linhagens ensaiadas, onde cerca de 70% delas apresentou um valor de recuperação superior a 100% em relação ao meio de controle. Contudo, foi observado, que o desenvolvimento pleno para a obtenção dos resultados só se verificou após 48 horas de incubação para as condições de ensaio (Tabelas I e Ia). As excessões foram poucas para os crescimentos em 24 horas. Pode ser aventada a hipótese de que o indicador exerceu uma certa ação bactericida e/ou bacteriostática sobre a maioria das linhagens, fazendo com que a fase de adaptação ao meio ("lag phase") fosse bem maior do que aquela verificada com o meio de controle, sem o indicador, para o mesmo período de incubação .

( Uma característica desse meio (BHISVN) é que, tão logo haja crescimento de um número relativamente baixo de micro-

organismo, o indicador inicia a viragem do vermelho claro inicial para o amarelo. Esta viragem, contudo, dá-se a partir da base do tubo (Fig. III) ).

O mesmo fato não ocorreu com a linhagem de Micrococcus, submetida ao mesmo tipo de análise. Mesmo após quatro dias de incubação no meio proposto, esse organismo não apresentou qualquer evidência de crescimento. Já no meio oficial houve a presença de um leve crescimento na primeira diluição do ensaio ($10^{-6}$) para o mesmo período de incubação.

Considerando que o Staphylococcus encontra-se habitualmente associado ao Micrococcus nos produtos alimentares , especialmente naqueles submetidos a salga, sua detecção e enumeração poderá ser facilitada por esse meio.

Nos ensaios preliminares, os melhores resultados foram obtidos para o meio proposto contendo 9,0% de cloreto de sódio. Entretanto, como não houve uma diferença muito significativa para a concentração de sal a 10%, essa percentagem foi a utilizada para os ensaios, visando tornar o meio mais seletivo.

Cerca de 50% das linhagens enterotoxigênicas, notadamente a S 113-1 (produtora de enterotoxina C), parece ter ressentido a presença do indicador e/ou do sal no meio proposto (Tabela II), embora suas contagens no meio controle também tenham sido relativamente baixas (Tabelas I e Ia).

## 2. Testes da DNA'se e da Coagulase

Em se tratando de um meio líquido, houve a possibili

dade de serem testadas cerca de 50% das linhagens para as provas de coagulase e DNA'se. Pelos resultados obtidos (Tabelas III e IV), a idéia é que a modificação do meio básico (BHI) não interferiu com a atividade das enzimas coagulase e DNA'se. Dessa maneira, foi possível serem conjugados os métodos de determinação do NMP e os testes da coagulase e DNA'se, utilizando o mesmo meio de crescimento (BHISVN).

A fim de ser verificado um falso resultado positivo para as amostras desenvolvidas nesse meio, foram utilizadas duas linhagens de reação negativa para os testes de coagulase e DNA'se. Os resultados foram concordantes com o previsto, embora a linhagem S 50-39 tenha dado resultado positivo para coagulase em 24 horas e DNA'se em 12 horas.

Visando ainda a real efetividade do meio proposto para os testes da DNA'se, em nenhuma das 20 linhagens estudadas houve reação positiva nos orifícios contendo o referido meio sem o inóculo. Procedimento semelhante foi adotado para os testes da coagulase, para a observação de qualquer falso resultado positivo. Nos tubos controle, em nenhum caso, houve coagulação do plasma. Inclusive, em alguns ensaios, foi também adicionado 0,5 ml do meio sem inóculo a 0,5 ml de plasma, para detectar possível interferência do indicador e/ou do NaCl com a reação positiva. Também, nesse caso, não foi verificado qualquer modificação no plasma controle.

### 3. *Staphylococcus versus Micrococcus glutamicus*

O meio proposto foi efetivo quanto a inibição do *Mi-*

crococcus. Pudemos comprovar, também, pelo menos à primeira vista, que o meio BHI não foi um bom meio de crescimento para esse organismo em particular (Tabela V).

Ao serem feitas as caracterizações das culturas mistas que cresceram no meio de controle, um fato inusitado chamou a atenção. De 10 colônias isoladas ao acaso nesse meio, 9 delas foram caracterizadas como sendo Micrococcus. Peterson e Gunderson (39 e 40) sugerem a possibilidade de um efeito da competição entre o S. aureus e outras bactérias, como as psicrófilas e saprófitas em geral. Todavia, não encontramos na literatura consultada, qualquer referência quanto a competição entre o S. aureus e Micrococcus sp. Como o principal objetivo desse trabalho foi o de conseguir um meio seletivo para a determinação do número mais provável para Staphylococcus aureus, deixamos de investigar essa possível competição com o Micrococcus em um meio não seletivo. Fica aqui apenas o registro do que foi encontrado, para futuras investigações a esse respeito.

## VI - CONCLUSÃO

1. O meio proposto, embora não sendo o meio ideal, satisfez plenamente os objetivos do trabalho.

2. Mostrou ser efetivo para o crescimento da maioria das linhagens de S. aureus ensaiadas; inclusive para os tipos reconhecidamente enterotoxigênicos.

3. O método apresenta a vantagem de poderem ser realizados os testes de coagulase e DNA'se, a partir das culturas desenvolvidas no próprio meio para a contagem do NMP.

4. Dependendo do tipo de produto a ser determinado o NMP, a concentração do corante pode ser modificada para 0,01%, sem que essa alteração venha a causar qualquer problema com os estafilococos, tornando, dessa maneira , o meio mais seletivo.

5. A metodologia é válida, em princípio, para os produtos alimentares não submetidos a processamento. Sendo essa ressalva feita devido a introdução, além do NaCl a 10%, também do indicador vermelho neutro que demonstrou certo poder bactericida e/ou bacteriostático em algumas das linhas estudadas.
   Essa precaução, no fornecimento dos resultados, deve ser levada em conta.

6. Assumindo os critérios adotados para a quantificação dos testes de coagulase e DNA'se (termorresistente e termolábil), a grande maioria das linhagens ensaiadas correspondeu plenamente a esses testes, já nas primeiras duas horas de incubação.

QUADRO I - Bacteriófagos empregados na tipificação das linhagens usadas nos ensaios (Tipos: 1 x RTD e 100 x RTD)

A. Conjunto básico internacional:

1 - Grupo I : 29, 52, 52A, 79, 80

2 - Grupo II : 3A, 3C, 55, 71

3 - Grupo III: 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85

Não classificados: 81, 94, 95, 96

B. Conjunto experimental: 86, 88, 89, 90, 92, D11, HK2

C. Conjunto extra: 187, 42D

QUADRO II - Fagotipagem I x RTD

| ORGANISMO | CONJUNTO BÁSICO INTERNAC. GRUPOS I | II | III | NÃO CLASSIFICADOS | CONJUNTO EXPERIMENTAL | CONJUNTO EXTRA |
|---|---|---|---|---|---|---|
| S 3b | T | NR | T | 81/95 | 86/88/89/90/92/D11 | NR |
| S 12 | 79 | NR | 85 | NR | NR | NR |
| S 14 | 79 | NR | 85 | NR | D11 | NR |
| S 15a | 29/52/79 | NR | NR | NR | NR | NR |
| S 17 | 29 | NR | 53/83A/85 | NR | 90/D11 | NR |
| S 20 | NR | NR | 53/83A/85 | NR | 90 | NR |
| S 26 | NR | NR | 6/47/53/54/83A/85 | NR | 88/89 | NR |
| S 27 | NR | NR | 6/47/53/54/83A/85 | NR | 88/89 | NR |
| S 35 | NR | NR | 6/47/53/54/83A/85 | NR | 88/89 | NR |
| S 50 | NR | NR | 53/54/84/85 | 95 | NR | NR |
| S 50-4 | NR | NR | 47/53/54/77 84/85 | 95 | NR | NR |
| S 50-7 | | | 53/54/77/84 85 | 95 | NR | NR |
| S 50-20 | NR | NR | 47/53/54/77 84/85/95 | NR | NR | NR |
| S 50-22 | NR | NR | 47/53/54/77 84/85/95 | NR | NR | NR |
| S 50-37 | NR | NR | 53 | 95 | NR | NR |
| S 70 | NR | NR | NR | 95 | NR | NR |
| S 85 | NR | NR | NR | NR | 89/90/92 | NR |
| S 87 | NR | NR | NR | NR | 86 | NR |
| S 87-1 | NR | NR | NR | NR | 86 | NR |
| S 89 | NR | NR | NR | NR | 89/90/92 | NR |
| S 104-1 | NR | NR | NR | 96 | NR | NR |
| S 105 | NR | NR | NR | 96 | NR | NR |
| S 106 | NR | NR | NR | 96 | NR | NR |
| S 107 | T | NR | 42E/83A | 81/95 | 86/92/D11 | 42D |
| S 108 | T | NR | 42E/83A | 81/95 | 86/92/D11 | 42D |
| S 109 | T | NR | 42E/83A | 81/95 | 86/92/D11 | 42D |
| S 119 | NR | NR | NR | NR | 86 | NR |
| S 120 | NR | NR | NR | NR | 86 | NR |
| S 121 | NR | NR | NR | NR | 86 | NR |
| S 137(FRI) | NR | NR | NR | NR | D11 | NR |
| S 472(FRI) | NR | NR | 42E/77/84 | NR | NR | 42D |

T = Todos do grupo reagiram; NR = Não Reagiu

Linhagens que não reagiram a qualquer dos fagótipos testados: S 6(FRI); S 50-18; S 50-39; S 65; S 68; S 69; S 100(FRI); S 101; S 111; S 113 ; S 113-1; S 326(FRI).

QUADRO III: Linhagens que apresentaram reatividade a fagotipagem 100 x RTD

1. S 65 - Conjunto experimental: 86

2. S 68 - Conjunto básico do Grupo I: 29

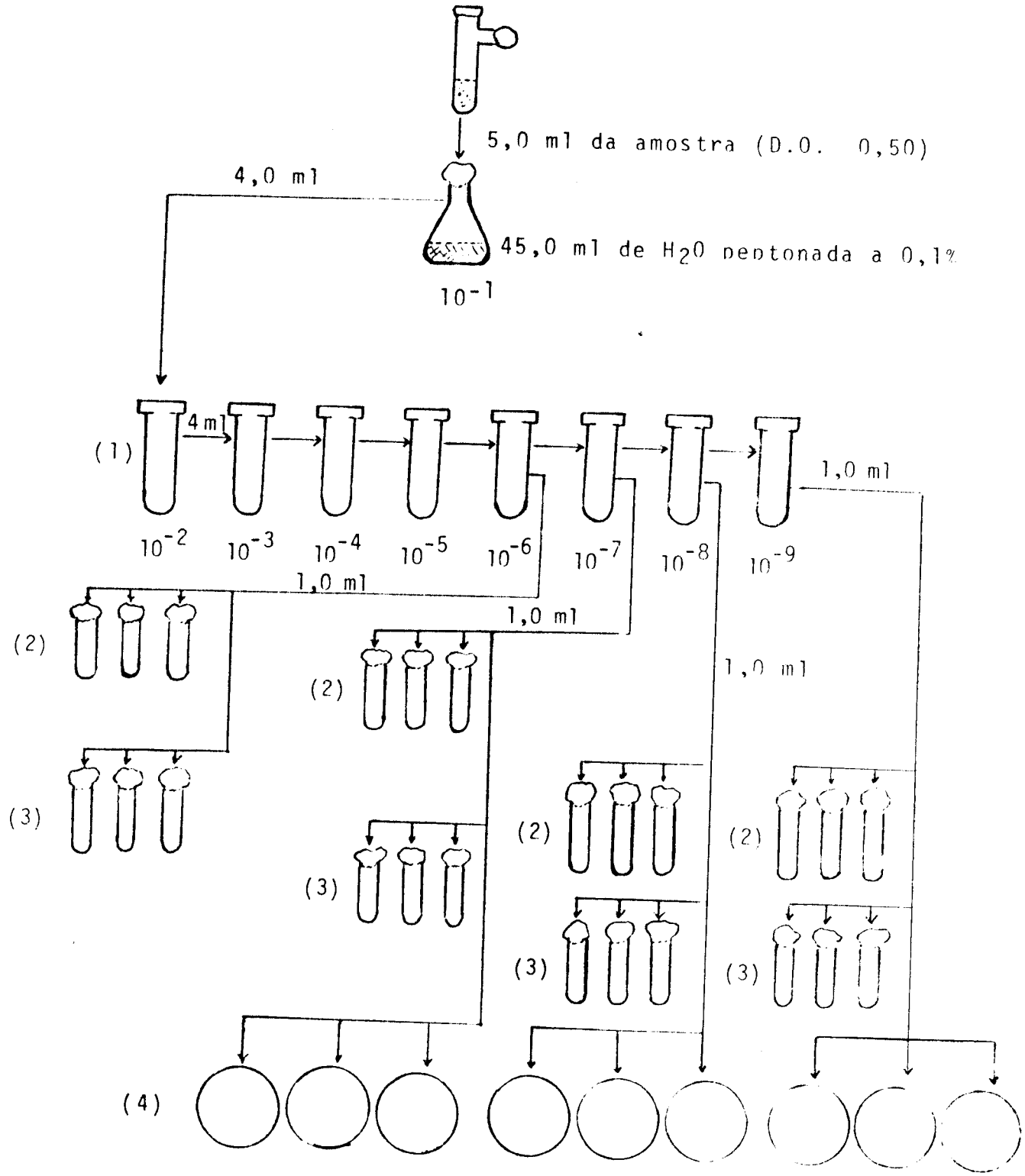
3. S 69 - Idem, 69

4. S 101 - Conjunto experimental: 86

5. S 326 (FRI) - Conjunto extra: 187

6. S 472 (FRI) - Conjunto básico do Grupo I: 29/52/79
   - Não classificado: 81
   - Conjunto básico do Grupo III: todos
   - Conjunto experimental: 86/88/89/92/D11/HK2
   - Conjunto extra: 42D

FIGURA I: Fluxograma empregado na diluição e inoculação das amostras.




(1) tubos com 36,0 ml de $H_2O$ peptonada; (2) tubos com 10,0 ml de BHISVN; (3) tubos com 10,0 ml de TSBS; (4) placas com meio BHI Agar (controle).

BIBLIOTECA CENTRAL

FIGURA II: Teste positivo da coagulase, a partir de uma cultura de 36 horas em BHISVN e TSB, respectivamente.

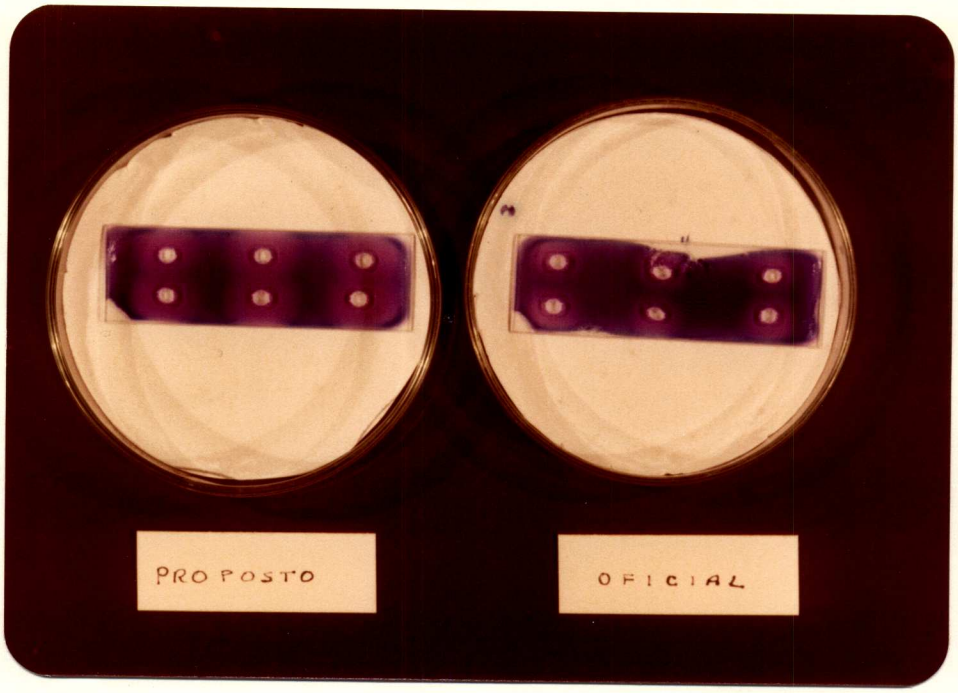
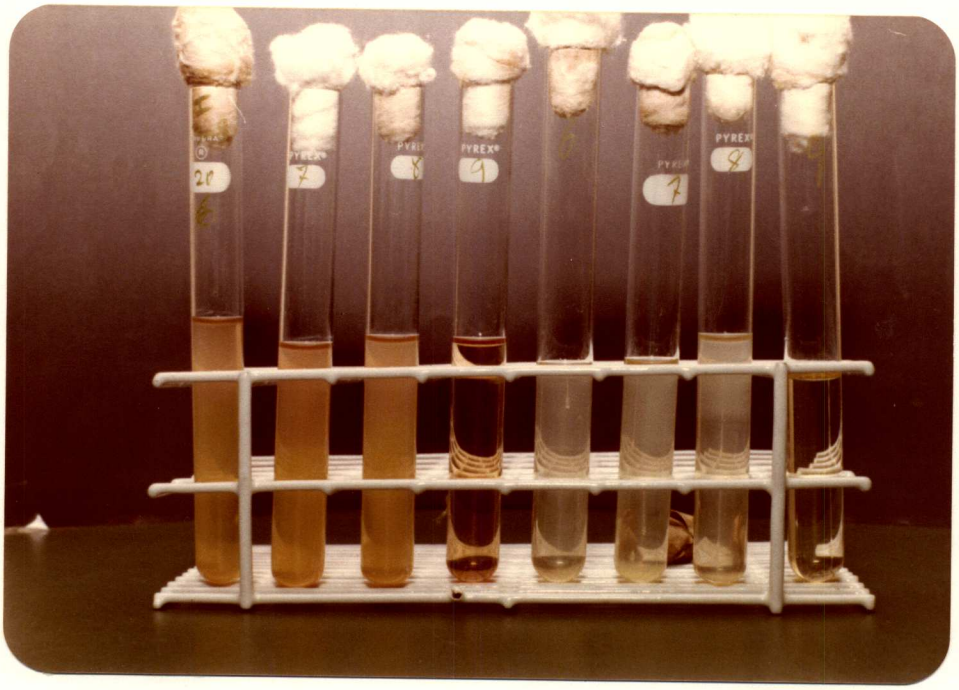



FIGURA III: Tipo de crescimento do S. aureus nos meios proposto e oficial.



(a)

TABELA I - Estafilococos por ml da suspensão bacteriana na D.O. 0,50 .

| LINHAGEM | NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) x $10^7$ | | | | CONTAGEM EM PLACAS | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MÉTODO PROPOSTO | | MÉTODO OFICIAL | | MÉTODO PADRÃO | |
| | Incubação em hs. | | Incubação em hs. | | Incubação em hs. | |
| | 24 | 48 | 24 | 48 | 24 | 48 |
| S 3b | 14,2 | 16,7 | 0,018 | 5,12 | 4 | 5 |
| S 6(FRI) | 16,0 | 110,0 | 19 | 90 | 72 | 73 |
| S 12 | 59 | 89 | 12 | 15 | 42 | 42 |
| S 14 | 25 | 60 | 17 | 18,5 | 72 | 72 |
| S 15a | 1,32 | 9,3 | 1,42 | 14,2 | 27 | 27 |
| S 17 | 46 | 110 | 5,8 | 25,2 | 51 | 51 |
| S 20 | 19,5 | 78 | 6,8 | 62,5 | 57 | 57 |
| S 26 | 67 | 67 | 13,2 | 35 | 32 | 32 |
| S 27 | 46 | 46 | 24,2 | 24,2 | 43 | 43 |
| S 35 | 0,36 | 83 | 4,7 | 6,4 | 37 | 37 |
| S 50 | 0,89 | 12 | 1,15 | 2,2 | 30 | 21 |
| S 50-4 | 4,5 | 89 | 48 | 53 | 46 | 46 |
| S 50-7 | 39 | 39 | 12,5 | 21,5 | 36 | 36 |
| S 50-18 | 3,2 | 11 | 1,2 | 11 | 22 | 22 |
| S 50-20 | 81 | 81 | 39 | 68 | 63 | 63 |
| S 50-22 | 80 | 83 | 14 | 34 | 50 | 50 |
| S 50-37 | 9,7 | 17 | 8 | 41 | 40 | 40 |
| S-50-39 | 110 | 110 | 24 | 31 | 41 | 41 |
| S 65 | 1,8 | 48 | 0,24 | 1,4 | 34 | 35 |
| S 68 | 34 | 110 | 0,33 | 0,54 | 50 | 50 |
| S 69 | 13,2 | 78 | 35 | 78 | 74 | 74 |

(s e g u e )

(continuação - TABELA Ia)

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| S 70 | 35 | 110 | 6,8 | 46 | 72 | 72 |
| S 85 | 8 | 14 | 0,65 | 1,1 | 26 | 27 |
| S 87 | 1,6 | 47 | 2,2 | 6,7 | 43 | 43 |
| S 87-1 | 25,5 | 67 | 26,5 | 39 | 39 | 39 |
| S 89 | 1,6 | 26 | 1,5 | 4,9 | 30 | 30 |
| S 100(FRI) | 0,2 | 31 | 0,17 | 0,9 | 41 | 41 |
| S 101 | 0,31 | 10 | 0,83 | 110 | 63 | 63 |
| S 104-1 | 15 | 62 | 2,1 | 46 | 46 | 46 |
| S 105 | 15,2 | 67 | 59,6 | 78 | 29 | 31 |
| S 106 | 12 | 110 | 5,8 | 24 | 34 | 36 |
| S 107 | 7,5 | 78 | 15 | 110 | 48 | 48 |
| S 108 | 3,5 | 67 | 8,7 | 63 | 46 | 46 |
| S 109 | 8,4 | 67 | 1,8 | 9,8 | 40 | 40 |
| S 111 | 1,7 | 33 | 75 | 75 | 47 | 47 |
| S 113 | 16 | 17 | 3,8 | 19 | 36 | 36 |
| S 113-1 | 1,9 | 10 | 14 | 67 | 58 | 58 |
| S 119 | 46 | 46 | 16 | 24 | 42 | 42 |
| S 120 | 62,5 | 78 | 55 | 67 | 47 | 47 |
| S 121 | 110 | 110 | 67,5 | 78 | 81 | 81 |
| S 137(FRI) | 3,6 | 55 | 2,3 | 60 | 55 | 55 |
| S 326(FRI) | 31 | 90 | 12 | 31 | 43 | 44 |
| S 472(FRI) | 42 | 110 | 31 | 31 | 73 | 73 |

(a) Os números acima representam a média aritmética de três análises de cada linhagem.

TABELA II: Percentagem de recuperação das 43 linhagens nos dois meios estudados em relação ao meio controle [a].

| LINHAGEM | BHISVN[b] | | TSBS[c] | |
|---|---|---|---|---|
| | 24 hs | 48 hs | 24 hs | 48 hs |
| S 3b | | 37 | | 11 |
| S 6(FRI)[d] | | 244 | | 200 |
| S 12 | | 197 | | 33 |
| S 14 | | 133 | | 41 |
| S 15a | | 21 | | 32 |
| S 17 | | 244 | | 56 |
| S 20 | | 173 | | 139 |
| S 26 | | 149 | | 78 |
| S 27 | | 102 | | 54 |
| S 35 | | 184 | | 14 |
| S 50 | | 27 | | 5 |
| S 50-4 | | 197 | | 118 |
| S 50-7 | | 86 | | 48 |
| S 50-18 | | 24 | | 24 |
| S 50-20 | | 180 | | 151 |
| S 50-22 | | 184 | | 76 |
| S 50-37 | | 38 | | 91 |
| S 50-39 | | 244 | | 69 |
| S 65 | | 107 | | 3 |
| S 68 | | 244 | | 1,2 |
| S 69 | | 173 | | 173 |
| S 70 | | 244 | | 102 |
| S 85 | | 173 | | 2,4 |
| S 87 | | 104 | | 15 |
| S 87-1 | | 149 | | 87 |
| S 89[d] | | 58 | | 11,4 |
| S 100(FRI)[d] | | 69 | | 2,1 |
| S 101 | | 22 | | 244 |
| S 104-1 | | 138 | | 102 |

(s e g u e)

(Continuação - Tabela II)

| | | |
|---|---|---|
| S 105 | 149 | 173 |
| S 106 | 244 | 53 |
| S 107 | 173 | 244 |
| S 108 | 149 | 140 |
| S 109 | 149 | 22 |
| S 111 | 73 | 167 |
| S 113(d) | 38 | 42 |
| S 113-1(d) | 22 | 149 |
| S 119 | 102 | 53 |
| S 120 | 173 | 149 |
| S 121 | 244 | 173 |
| S 137(FRI)(d) | 122 | 133 |
| S 326(FRI)(d) | 200 | 69 |
| S 472(FRI)(d) | 244 | 69 |

(a) BHI Agar - assumindo 100% de recuperação

(b) Meio proposto

(c) Meio oficial

(d) Linhagens enterotoxigênicas

TABELA III: Testes de coagulase e DNA'se com estafilococos.

| ORGANISMO NÚMERO | COAGULASE CULTURA EM TSBS 2hs | COAGULASE CULTURA EM TSBS 4hs | COAGULASE CULTURA EM BHISVN 2hs | COAGULASE CULTURA EM BHISVN 4hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM TSBS T R 2hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM TSBS T R 4hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM TSBS T S 2hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM TSBS T S 4hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM BHISVN T R 2hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM BHISVN T R 4hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM BHISVN T S 2hs | DESOXI-RIBONUCLEASE CULTURA EM BHISVN T S 4hs |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S 3b | - | - | $1^+$ | $2^+$ | - | - | - | - | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 15a | $1^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 17 | - | - | - | $1^+$ | - | - | - | - | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ |
| S 26 | - | - | - | $2^+$ | - | - | - | - | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |
| S 27 | - | - | - | $1^+$ | - | - | - | - | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |
| S 50-18* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S 50-39* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S 68 | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |
| S 69 | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |
| S 70 | - | - | - | $2^+$ | - | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |
| S 104-1 | $1^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 105 | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $3^+$ |
| S 106 | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 107 | - | - | - | $2^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 108 | - | - | - | $2^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 109 | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 119 | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 120 | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |
| S 121 | $1^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ |

(*) - Mutantes da linhagem S 50.

TABELA IV: Testes de coagulase e DNA'se com estafilococos.

| LINHAGEM | COAGULASE | | | | DESOXI-RIBONUCLEASE | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CULTURA EM TSBS | | CULTURA EM BHISVN | | CULTURA EM TSBS | | | | CULTURA EM BHISVN | | | |
| | | | | | T R | | T S | | T R | | T S | |
| | 12hs | 24hs | 12hs | 24hs | 12hs | 24hs | 12hs | 24hs | 12hs | 24hs | 12hs | 24hs |
| S 3b | - | - | $3^+$ | $3^+$ | - | - | - | - | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 15a | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 17 | - | $3^+$ | $1^+$ | $3^+$ | - | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 20 | $1^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $3^+$ | - | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 26 | - | - | $2^+$ | $3^+$ | - | - | - | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 27 | - | $1^+$ | $2^+$ | $3^+$ | - | - | - | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 50-18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | $2^+$ | - | $2^+$ |
| S 50-39 | - | $2^+$ | - | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 68 | $2^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 69 | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 70 | - | - | $2^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |
| S 104-1 | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ |
| S 105 | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ |
| S 106 | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 107 | - | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 108 | - | $1^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 109 | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 119 | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $3^+$ | $2^+$ | $3^+$ |
| S 120 | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |
| S 121 | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ | $2^+$ |

TABELA V: Número de Staphylococcus vs. Micrococcus/ml de suspensão bacteriana D.O. 0,50.

| | NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) x $10^7$ | | | | CONTAGEM EM PLACAS | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MÉTODO PROPOSTO(a) Incubação em hs. | | MÉTODO OFICIAL(b) Incubação em hs. | | MÉTODO PADRÃO (c) Incubação em hs. | |
| | 24 | 48 | 24 | 48 | 24 | 48 |
| B-2968 * | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| B-2968 + S-137C$_1$ ** | 12,2 | 15 | 4,5 | 22,5 | 23,7 | 23,7 |
| B-2968 S-472 D ** | 8,4 | 30,5 | 8,7 | 26,7 | 90,2 | 90,2 |

* - USDA B-2698 : Micrococcus glutamicus

** - FRI 137C$_1$ : Staphylococcus aureus

- FRI 472 D : Staphylococcus aureus

(a) BHISVN - 0,5 ml da diluição decimal dos organismos.

(b) TSBS - 0,5 ml da diluição decimal dos organismos.

(c) BHI Agar - meio de controle

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) ALEXANDER, M. - Most probable number method for microbial populations. Amer. Society Agronomy, part 2: 1467 - 1472, 1965.

(2) AMERICAN Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 13. ed., New York, APHA, 1971. p. 661-679.

(3) ASSOCIATION of Official Analytical Chemists - Coagulase positiva staphylococci. 11 ed., Washington, AOAC , 1970. p. 843-844.

(4) BAIRD-PARKER, A.C. - The basis for the present classification of staphylococci and micrococci. Ann. N. Y. Acad. Sci., 236: 7-14, 1974.

(5) BERGDOLL, M.S. - The enterotoxins. In: Cohen, J.O. ed.- The staphylococci. New York, John Wiley, 1972. p. 301-331.

(6) BOOTHBY, J.; GENIGEORGIS, C. & FANELLI, M.J. - Tanden coagulase thermonuclease agar method for the detection of Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microbiol. 37(2): 298-302, 1979.

(7) BREED, R.S. et alii. eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 7. ed., Baltimore, The William and Wilkins, 1957.

(8) BUCHNAN, R.E. & GIBBONS, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 ed., Baltimore, The William and Wilkins, 1974.

(9) COCHRAN, W.G. - Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. Biometrics, 6: 105-116, 1950.

(10) COLLINS, C.H., ed. - Métodos microbiológicos. 2 ed., Zaragoza, Espanha, Ed. Acribia, 1969.

(11) CORDS, B.R. & TATINI, S.R. - Applicability of heat stable deoxyribonuclease assay for assessement of staphylococcal growth and presence of entoerotoxin in cheese. J. Dairy Sci., 56: 1512-1519, 1973.

(12) DAVIS, B.D. et alii - Staphylococcus. In: Microbiology. 6 ed., New York, Harper & Row, 1970. p. 728-740.

(13) DIFCO Laboratories - Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbial and clinical laboratory procedures. 9 ed., Detroit, Difco, 1953.

(14) EVANS, J.B. - Anaerobic fermentation of mannitol by staphylococci. J. Bacteriol. 54: 266, 1947.

(15) _____. - Studies of staphylococci with special reference to the coagulase-positive types. J. Bacteriol. 55: 793-800, 1948.

(16) EVANS, J.B.; BRADFORD, W.L. & NIVEN, C.F. - Comments concerning the taxonomy of the genera Micrococcus and Staphylococcus. Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon., 5: 61-66, 1955.

(17) EVANS, J.B. & NIVEN, C.F. - A comparative study of known food-poisoning staphylococci and related varieties. J. Bacteriol., 59: 545-550, 1950.

(18) ERICKSON, A. & DEIBEL, R.H. - Turbidimetric assay of staphylococcal nuclease. Appl. Microbiol., 25(3): 337-341, 1973.

(19) FOOD and Drug Administration - Bacteriological analytical manual. 4 ed., Washington, Association of Official Analytical Chemists, 1976.

(20) FUNG, D.Y.C. & MILLER, R.D. - Effect of dyes on bacterial growth. Appl. Microbiol, 25(5): 793-799, 1973.

(21) HALVORSON, H.O. & ZIEGLER, N.R. - Application of statistics to problems in bacteriology. I. A means of determining bacterial population by dilution method. J. Bacteriol., 26(4): 331-339, 1933a.

(22) _____._____. - Application of statistics to problems in bacteriology. II. A consideration of the accuracy of dilution date obtained by using a single dilution. J. Bacteriol., 26(4): 331-339, 1933b.

(23) _____._____. - Application of statistics to problems in bacteriology. III. A consideration of the accuracy of dilution date obtained by using several dilutions. J. Bacteriol, 26(4): 559-567, 1933c.

(23a) HAUSSLER, W.J. ed. - Standard methods for the examination of dairy products. 8 ed., Washington, American Public Health Association, 1972.

(24) HOLBROOK, R.; ANDERSON, J.M. & BAIRD-PARKER, A.C. - The performance of a stable version of Baird-Parker's medium for isolating Staphylococcus aureus. J. Appl. Bacteriol., 32(2): 187-192, 1969.

(25) JEFFRIES, C.D.; HOLTMAN, D.F. & GUSE, D.G. - Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J. Bacteriol., 73: 590-591, 1957.

(26) KEOGH, B.P. - Review of the progress of dairy science section B; the survival of pathogens in cheese and milk powder. J. Dairy Res., 38: 91-111, 1971.

(27) KOUPAL, A. & DEIBEL, R.H. - Rapid qualitative method for detecting staphylococcal nuclease in foods. Appl. Environ. Microbiol., 35(6): 1193-1197, 1978.

(28) LACHICA, R.V.F. - Simplified thermonuclease test for rapid identification of Staphylococcus aureus recovered on agar media. Appl. Environ. Microbiol., 32: 633-34, 1976.

(29) LACHICA, R.V.F. & DEIBEL, R.H. - Detection of nuclease activity in semisolid and broth cultures. Appl. Microbiol., 18(2): 174-176, 1969.

(29a) _____; GENIGEORGIS, C. & HOEPRICH, P.D. - Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol., 21 : 585-587, 1971.

(30) _____; WEISS, K.F. & DEIBEL, R.H. - Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat stable deoxyribonuclease production by Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 18: 121-127, 1969.

(31) McCARTHY, J.A.; THOMAS JR., H.A. & DELANEY, J.F. - Evaluation of the reability of coliform density tests. Amer. J. Pub. Health, 48: 1628-1635, 1958.

(32) MINOR, T.E. & MARTH, E.H. - Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxication. A review. 1. the staphylococci: caracteristics; isolation, and behavior in artificial media. J. Milk Food Technol., 34 (11): 557-564, 1971.

(33) MORTON, H.E. & COHN, J. - Coagulase deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources. Appl. Microbiol., 23(4): 725-733, 1972.

(34) MOSSEL, D.A.A. - Attempt in classification of catalase positive staphylococci and micrococci. J. Bacteriol. 84: 1140-1147, 1962.

(35) MUNOZ, E.F. & SILVERMAN, M.P. - Rapid, single-step most probable number method for enumerating fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. Appl. Environ. Microbiol., 37(3): 527-530, 1979.

(36) NISKANEN, A. & AALTO, M. - Comparison of selective media for coagulase-positive enterotoxigenic Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microbiol., 35(6): 1233-1236, 1978.

(37) OBLINGER, J.L. & KOBURGER, J.A. - Understanding and teaching the most probable number technique. J. Milk Food Technol., 38(9): 540-545, 1975.

(38) PARNOW, R.J. - Computer program estimates bacterial densities by means for the most probable numbers. Food Technol., 26(7): 58-62, 1972.

(39) PETERSON, A.C.; BLACK, J.J. & GUNDERSON, M.F. - Staphylococci in competition. II. Effect of toal numbers and proportion of staphylococci in mixed cultures on growth in artificial culture medium. Appl. Microbiol., 10: 23-30, 1962a.

(40) _____.; _____.; _____. - Staphylococci in competition. III. Influence of pH and salt on staphylococcal growth in mixed populations. Bact. Proced.: 33, 1962b.

(41) PHELPS, E.B. - A method for calculating the number of Bacillus coli from the results of dilution tests. Amer. J. Pub. Hyg., 4: 141-145, 1908.

(42) RAYMAN, M.K. et alii - Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 29(4): 451-455, 1975.

(43) ROBBINS, R.; GOULD, S. & BERGDOLL, M. - Detecting the enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strais. Appl. Microbiol, 28(6): 946-950, 1974.

(44) ROWE, R.; TODD, R. & WAIDE, J. - Microtechnique for most probable number analysis. Appl. Environ. Microbiol., 33(3): 675-680, 1977.

(45) SALZBERG, S.P. - Diferenças bioquímicas e fisiológicas de linhagens pigmentadas e não pigmentadas de Staphylococcus aureus. Campinas, 1976. Tese doutoramento, FEAA, UNICAMP, SP.

(46) SPECK, M.D. ed. - Compendium of methods for the microbial examination of foods. Washington, American Pub. Health Association, 1976. p. 381-384.

(47) SPERBER, W.H. - The identification of staphylococci in clinical and food microbiology laboratories. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 7: 121-184, 1976.

(48) SPERBER, W.H. & TATINI, S.R. - Interpretation of the tube coagulase test for the identification of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 29: 502-505, 1975.

(49) TURNER, F.J. & SCHWARTZ, B.S. - The use of a lyophilized human plasma standardized for blood coagulation and fibrinolytic tests. J. Lab. Clin. Med., 52: 888-894, 1958.

(50) VARALDO, P.E.; SATTA, G. & HAJEK, V. - Taxonomic study of coagulase-positive staphylococci: bacteriolitic activity pattern analysis. J. Syst. Bacteriol., 28(4): 445-448, 1978.

(51) VARALDO, P.E. et alii - Grouping of staphylococci on the basis of their bacteriolitic activity patterns; a new approach to the taxonomy of Micrococcaceae. I. Identification of six different "lyogroups". Int. J. Syst. Bacteriol, 28: 141-147, 1978.

(52) WOODWARD, R.L. - How probable is the most probable number. J. Amer. Water Works Assn., 49: 1060-1068, 1957.

(53) ZIEGLER, N.R. & ALVORSON, H.O. - Application of statistics to problems in bacteriology. IV. Experimental comparison of the dilution method, the plate count, and the direct count for the determination of bacterial populations. J. Bacteriol., 29: 609-633, 1935.

# AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. FUMIO YOKOYA, pela valiosa orientação deste trabalho;

- À Profª Dra. SONIA P. SALZBERG, pelas sugestões e conselhos;

- Ao Prof. HÉLCIO J.M SILVEIRA, Chefe do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC;

- Ao Prof. Dr. ANDRÉ TOSELLO, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola;

- À Profª Dra. YARA TOSELLO;

- Aos Srs. Hélcio Rodrigues, Lothar Backes, Odair e Luiz Henrique, pela grande colaboração na impressão deste trabalho;

- À todos os colegas, que de uma forma ou de outra, colaboraram na elaboração deste trabalho.