

## Avaliação do sistema Petrifilm™ HS na contagem de coliformes em leite pasteurizado

### Evaluation of the Petrifilm™ HS system for counting coliforms in pasteurized milk

RIALA6/1619

Andréia CIROLINI\*, Andressa Mara BASEGGIO, Roberta Juliano RAMOS, Helen da Silva SILVESTRE, Cristhiane Stecanella de Oliveira CATTANI, Cleide Rosana Werneck VIEIRA

\*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.  
E-mail: deiacirolini@yahoo.com.br

Recebido: 28.12.2013 - Aceito para publicação: 26.09.2014

#### RESUMO

Os métodos microbiológicos alternativos apresentam vantagens sobre os ensaios convencionais, no entanto é preciso confirmar sua eficácia. O presente trabalho avaliou o sistema Petrifilm™ HS com o sistema Petrifilm™ EC, em comparação com a metodologia convencional na contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado. Altas correlações foram encontradas entre as metodologias utilizadas para efetuar a contagem de coliformes a 35 °C. O sistema Petrifilm™ HS para contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado mostrou resultados satisfatórios.

**Palavras-chave.** Petrifilm™ HS, Petrifilm™ EC, coliformes, leite pasteurizado.

#### ABSTRACT

Alternative microbiological methods present several advantages over the conventional methodologies, but their efficiency should be confirmed. The present study aimed at analyzing Petrifilm™ HS and Petrifilm™ EC systems, and comparing with the conventional methodology for counting coliforms at 35 °C in pasteurized milk. High correlations were found among these methodologies used for coliforms counting at 35 °C. Petrifilm™ HS system presented satisfactory results for counting coliforms at 35 °C in pasteurized milk.

**Keywords.** Petrifilm™ HS, Petrifilm™ EC, coliforms, pasteurized milk.

## INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais utilizados pela população, devido sua riqueza de nutrientes, sendo, portanto importante garantir sua qualidade. A qualidade microbiológica do leite pasteurizado é influenciada pela matéria-prima e por condições de processamento e pós-pasteurização<sup>1</sup>.

O controle microbiológico em amostras de leite é realizado, principalmente, através da pesquisa de micro-organismos indicadores, os quais podem fornecer informações sobre as condições sanitárias durante produção, processamento e armazenamento, sobre a estimativa da vida de prateleira do produto, assim como sobre a possível presença de patógenos<sup>2</sup>. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 62/2011, reúne as normas de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e o seu transporte a granel<sup>3</sup>.

Os métodos microbiológicos convencionais empregados para contagem de bactérias utilizam procedimentos que envolvem a homogeneização, diluições, inoculação em placas com ágar específicos para a formação de colônias e contagem. Muitas vezes, outras etapas também precisam ser realizadas para permitir que micro-organismos injuriados por tratamentos físicos e químicos recuperem-se e multipliquem até níveis detectáveis<sup>4</sup>. A técnica do Número Mais Provável (NMP), também chamada de técnica dos tubos múltiplos, é outra maneira bastante utilizada pelos laboratórios de microbiologia de alimentos para estimar a contagem de alguns tipos de micro-organismos, como coliformes totais (a 35 °C), coliformes termotolerantes (a 45 °C), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*<sup>2</sup>.

Os métodos microbiológicos convencionais, embora sejam confiáveis e eficientes, exigem disponibilidade de tempo e grande trabalho laboratorial<sup>5</sup>. Desta forma, métodos alternativos têm sido desenvolvidos para obter o resultado final em menos tempo. Tais métodos são bastante desejáveis na indústria de alimentos, apesar das técnicas poderem ser mais caras e requererem pessoal com alto nível de treinamento<sup>4</sup>.

Um dos métodos alternativos utilizados para contagem de micro-organismos em alimentos é o sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA). O teste

é constituído por um sistema de filme duplo, sendo a base do cartão revestida de polietileno recoberta com meio de cultura desidratado, que contém nutrientes e um agente gelificante solúvel em água fria; o filme superior é transparente, removível e contém um corante indicador<sup>2</sup>. As placas de contagem de coliformes possuem como meio de cultura base o ágar vermelho violeta bile, corante indicador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e agentes gelificantes<sup>6</sup>. As placas de Petrifilm™ para contagem de coliformes podem ser classificadas como Petrifilm™ *E. coli* (EC) e Petrifilm™ High Sensitive (HS), sendo que a diferença entre elas é que a do tipo HS permite a inoculação de 5 mL de homogeneizado de alimento<sup>7</sup>, enquanto a do tipo EC permite a inoculação de 1 mL.

A *Association Official Analytical Chemists* (AOAC) e *Association Française de Normalisation* (AFNOR) reconhecem as placas Petrifilm™ EC e HS como método oficial<sup>8,9</sup>.

Alguns aspectos importantes do alimento podem influenciar o desempenho dos métodos alternativos como, por exemplo, o pH, a atividade de água, a presença de conservantes, certos componentes, como lipídios e sais e a cor do alimento<sup>10</sup>.

Baseado na importância de que a presença de coliformes em leite pasteurizado é uma forma de avaliação da qualidade geral do produto, este trabalho teve por objetivos analisar a viabilidade do emprego de um teste de alta sensibilidade (Petrifilm™ HS) e comparar seu desempenho com sistema Petrifilm™ EC e a metodologia convencional para a contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado produzido em laticínios do Estado de Santa Catarina – Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Cento e quarenta e uma amostras de leite pasteurizado foram coletadas em seis laticínios com sistema de Inspeção Federal (SIF), do estado de Santa Catarina/Brasil, entre dezembro de 2009 e novembro de 2011. A coleta foi realizada por um fiscal sanitário do Ministério da Agricultura (SFA/SC).

As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi realizada a verificação da temperatura com termômetro digital (Wertern®).

### Análises microbiológicas

As embalagens foram homogeneizadas e desinfetadas com álcool 70 %. Foram realizadas diluições decimais, utilizando-se água peptonada (0,1 %) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England)<sup>11</sup> e os ensaios de contagem de coliformes a 35 °C foram realizados em sistema Petrifilm™ HS, Petrifilm™ EC e pela metodologia convencional.

### Sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA)

As placas Petrifilm™ HS e Petrifilm™ EC foram inoculadas com alíquotas de 5 mL e 1 mL de amostra, respectivamente e incubadas a 35 °C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, realizou-se a contagem de colônias vermelhas associadas à formação de gás<sup>6</sup>.

### Metodologia convencional

Os ensaios de coliformes a 35 °C foram realizados de acordo com Davidson, Roth e Gambrel-Lenarz<sup>12</sup>, pela técnica de plaqueamento em profundidade. Alíquotas de 1 mL foram inoculadas, em duplicata, em placas de Petri, sendo adicionado ágar vermelho violeta bile (VRBA - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). As placas foram incubadas a 32 °C ± 1 °C por 24 horas e, após este período de incubação, realizou-se a contagem de colônias vermelhas com 5 mm. Para teste confirmatório, três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo caldo bile verde brilhante 2 % lactose (BVB - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), incubados a 35 °C ± 1 °C por 48 horas, sendo que resultado final de coliformes a 35 °C foi expresso a partir da positividade dos tubos, caracterizada pela turvação e pela produção de gás em cada tubo individualmente.

### Análise estatística

Os valores obtidos foram convertidos em forma logarítmica e, na sequência, foram submetidos à análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica® 8.0<sup>13</sup>.

Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos foram < 1 UFC/mL, estes resultados foram substituídos pelo número imediatamente inferior, ou seja, 0,9 UFC/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras de leite pasteurizado, a presença de coliformes a 35 °C determinada pelo sistema Petrifilm™ HS foi de 47,5 % (67/141), no sistema Petrifilm™ EC foi de 36,2 % (51/141) e na metodologia convencional foi de 34,7 % (49/141).

O coeficiente de correlação entre os resultados obtidos sistema Petrifilm™ HS e pela metodologia convencional para a contagem de coliformes a 35 °C mostrou uma associação linear positiva (Figura 1).

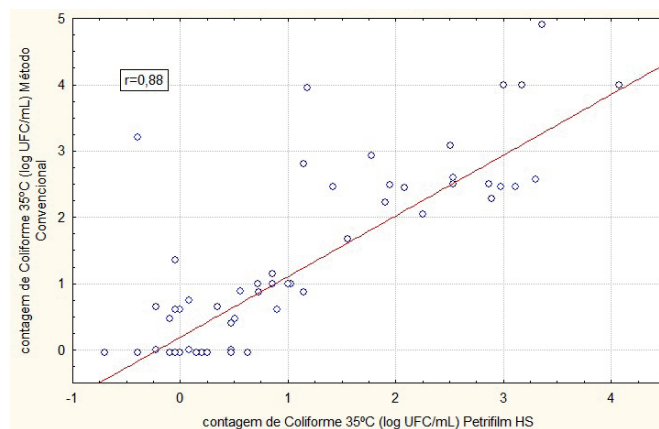
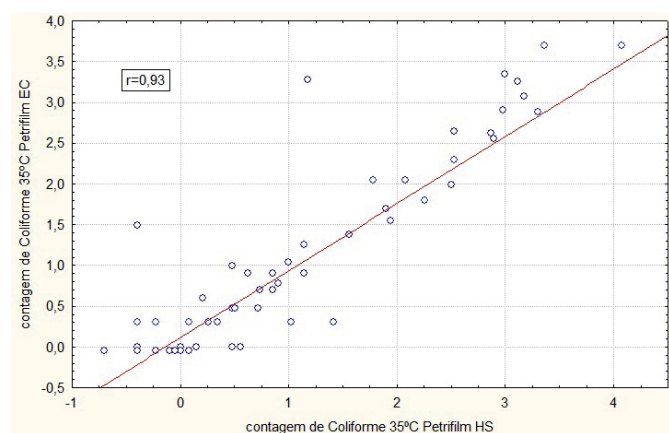


Figura 1. Dispersão dos resultados da contagem de coliformes a 35 °C (log UFC/mL) em leite pasteurizado utilizando Petrifilm™ H Semétodo convencional

A alta correlação encontrada na contagem de coliformes a 35 °C entre o sistema Petrifilm™ HS com a metodologia convencional está de acordo com resultados de Beloti et al<sup>7</sup>, que encontraram coeficiente de correlação de 0,90 entre o sistema Petrifilm™ HS e a técnica do NMP, ao analisarem 145 amostras de água.

Raybaudi et al<sup>1</sup> encontraram diferença significativa na contagem de coliformes em amostras de leite pasteurizado ao compararem o sistema Petrifilm™, o método do NMP e um método proposto por Shertha e Sinha<sup>14</sup>, usando Violet red bile (VRB) e demonstraram que o teste proposto por Shertha e Sinha recuperou maiores níveis de coliformes, seguido do método do NMP. De acordo com os autores, os meios de cultura líquidos oferecem melhores condições de multiplicação para os micro-organismos quando comparado com meios sólidos, o que poderia explicar a melhor recuperação no teste proposto por Shertha e Sinha e o método do NMP.

O sistema Petrifilm™ HS também mostrou uma alta correlação com o sistema Petrifilm™ EC (r=0,93) na contagem de coliformes a 35 °C (Figura 2).



**Figura 2.** Dispersão dos resultados da contagem de coliformes a 35 °C (log UFC/mL) em leite pasteurizado utilizando Petrifilm™ HS e Petrifilm™ EC

Silva et al<sup>5</sup> avaliaram o sistema Petrifilm™ EC em comparação com a técnica dos tubos múltiplos na detecção de coliformes a 35 °C em queijo minas, lingüiça frescal, hortaliças e fubá. O sistema Petrifilm™ EC mostrou-se mais eficiente e prático, sendo um método alternativo adequado para a enumeração de coliformes a 35 °C em alimentos.

Também pode-se observar uma alta correlação ( $r=94$ ) utilizando o método convencional e o sistema Petrifilm™ EC na contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado.

Apesar das altas correlações encontradas na avaliação do sistema Petrifilm™ HS para contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado, no Brasil, o sistema Petrifilm™ HS não é reconhecido como método oficial pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. No entanto, este sistema apresenta como vantagem uma redução do tempo de 48 horas para a emissão do resultado final em comparação a metodologia convencional. Essa otimização do tempo de análise permite a indústria de alimentos maior agilidade, como, na verificação da qualidade do alimento, na liberação de lotes e na tomada de decisões. Aliado a isso a metodologia alternativa apresenta uma melhor praticidade laboratorial, pela redução do material utilizado em laboratório, preparo dos meios de cultura e do volume de resíduos gerados durante o ensaio. Como destaca Cattani et al<sup>15</sup>, faz-se necessário utilizar metodologias alternativas à convencional na rotina diagnóstica dos laboratórios para obtenção de resultados confiáveis e em menor tempo possível.

## CONCLUSÃO

O sistema Petrifilm™ HS mostrou resultados satisfatórios para o ensaio de coliformes a 35 °C em leite

pasteurizado, podendo ser uma alternativa à metodologia convencional.

## REFERÊNCIAS

1. Raybaudi RM, Zea ZA, Curini G, Martinez A JY. Comparison of a rapid procedure with the MNP and Petrifilm methods for the detection of coliforms in pasteurized milk. *J Rapid Methods Autom Microbiol*.2005;13:11-8.
2. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2005.
3. Brasil. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Cru refrigerado, Leite Pasteurizado, Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1.
4. Forsythe SJ. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
5. Silva MP, Cavalli DR, Oliveira TCRM. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciênc Tecnol Aliment*.2006;26:352-9.
6. Kornacki JL, Johnson JL. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association: Washington; 2001, p.69-82.
7. Beloti V, Souza JA, Barros MAF, Nero LA, Mattos MR, Gusmão VV et al. Evaluation of Petrifilm™ EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. *Braz J Microbiol*.2003;34:301-4.
8. Association Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*. 17 ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists;2002.
9. NF Validation. Validation of Alternative Analysis Methods - Application to Foodstuffs (Nf102). [acesso 2014 jun 19]. Disponível em: [http://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/04/List-of-methods-certified-NF-VALIDATION-Food.pdf].
10. Tavolaro P, Ferrati AR, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. *Braz J Microbiol*.2005;36:295-300.
11. Brasil. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 18 set. 2003.
12. Davidson PM, Roth LA, Gambrel-Lenarz SA. Coliform and other indicator bacteria. In: Wehr H M, Frank JF, editor. *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association; 2004, cap. 7; p. 187-203.
13. Statsoft Inc, *Statistica (Data Analysis Software System)*, version 8, www.statsoft.com.2004.
14. Shrestha KG, Sinha RN. A rapid method for detection of coliforms in processed milk products. *Aust J Dairy Technol*.1990;5:27-30.
15. Cattani CSO, Fuchs PIP, Cirolini A, Vieira CRW. Métodos alternativos para contagem de micro-organismos em carcaças suínas. *Cienc Rural*.2013;43:1031-6.