

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS RÁPIDOS SIMPLATE^R TPC- CI E PETRIFILM^R AC E OS MÉTODOS CONVENCIONAIS DE CONTAGEM EM PLACAS PARA A ENUMERAÇÃO DE AERÓBIOS MESÓFILOS EM SORVETES¹

Anderson de Souza SANT'ANA^{2,*}, Caetano da CONCEIÇÃO², Denise Rosane Perdomo AZEREDO²

RESUMO

A contagem de aeróbios mesófilos ou contagem padrão em placas em um produto alimentício reflete a qualidade da matéria-prima, bem como as condições de processamento, manuseio e estocagem. O método de contagem em placas tradicionais requer 48h de incubação para a posterior leitura dos resultados. Comparou-se dois métodos que parecem ser uma boa alternativa para a contagem padrão em placas: Simplate^R TPC-CI e Petrifilm^R AC. Também avaliou-se a capacidade inibitória do 2, 3, 5 cloreto de trifêniltetrazólio quando adicionado ao Agar Plate Count. Este corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido pelos microrganismos, devido à formação de formazano. O coeficiente de correlação obtido, através de estudos conduzidos com 60 amostras de sorvetes, entre 0,866-0,979 indicou uma equivalente sensibilidade dos métodos testados. Somente a contagem padrão em placas com TTC diferiu significativamente da contagem padrão em placas.

Palavras-chave: Contagem Padrão em Placa; métodos rápidos; sorvetes; 2, 3, 5 cloreto de trifêniltetrazólio; TTC.

SUMMARY

COMPARISON OF SIMPLATE^R TEST AND PETRIFILM WITH PLATE COUNT AGAR METHOD FOR DETECTION AND ENUMERATION OF BACTERIA IN ICE CREAM. The mesophilic aerobic plate count or standard plate count (SPC) of fresh food product reflects conditions of raw product quality, processing, handling and storage. Current standard methods require a 48h incubation period to obtain the results. Two rapid alternative methods: SimplateTM TPC-CI and PetrifilmTM Aerobic Count (AC) Plate were compared to standard methods. Also, we evaluated the inhibitory effect of 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) when added to Plate Count Agar. This dye is colorless in the oxidized form and red when reduced by microorganisms, due to the formation of formazan. Sixty ice cream samples were used in this study to obtain correlation coefficients, which ranged from 0.866-0.979, indicating equivalent sensitivities to existing methods. Only plate count with TTC differed significantly from the standard plate count.

Keywords: Standard plate counts; rapid methods; ice-cream; 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride; TTC.

1 – INTRODUÇÃO

A Contagem Padrão em Placa ou contagem de aeróbios mesófilos em um produto alimentício, reflete a qualidade da matéria-prima, bem como as condições de processamento, manuseio e estocagem [11], permitindo estimar o tempo de prateleira do alimento em questão. Em termos laboratoriais, a execução desta técnica é bem simples, consistindo no plaqueamento de alíquotas da amostra, homogeneizada e diluída, em meio de cultura padrão como o "Plate Count Agar" (PCA). As placas são então, incubadas em condições de tempo e temperaturas adequados, para que haja o desenvolvimento das colônias que serão enumeradas com o auxílio de contadores automáticos. Trata-se, no entanto, de um processo bastante susceptível a erros, levando-se em consideração que: os microrganismos estão arranjados em pares, tétrades, cadeias e cachos. Conseqüentemente o número de colônias que aparecem na placa não correspondem ao número de células individuais presentes; quando muitas diluições precisam ser plaqueadas podem ocorrer erros; algumas partículas de alimentos podem ser confundidas com colônias, levando a um falso resultado positivo; o modo de leitura e a interpretação dos resultados, são muito subjetivos e podem variar de acordo com o analista; algumas colônias denominadas invasoras se espalham

pela placa dificultando a contagem e a expressão do resultado final.

Outras limitações do método estariam relacionadas à fisiologia das diferentes espécies microbianas nos alimentos, que podem ter seu crescimento limitado quando são usadas condições padronizadas de temperatura, requerimento de nutrientes e potencial redox.

Visando minimizar estes problemas, surgiram os métodos alternativos que apresentam a conveniência de produzirem resultados mais rápidos, sensíveis e específicos, se comparados às técnicas convencionais. Tais métodos também podem oferecer economia de espaço e materiais, aumentando a produtividade laboratorial.

Numerosos métodos alternativos de contagem em placas estão disponíveis visando melhorar a eficiência desta determinação. Dentre eles, destacam-se o Simplate^R Total Plate Count – Color Indicator (TPC-CI) e as placas Petrifilm^R AC [20] para contagem de bactérias aeróbias totais. O sistema Simplate^R é um método de enumeração de microrganismos em alimentos que fornece resultados em número mais provável (NMP), baseado no número de cavidades positivas de uma placa especialmente desenvolvida. Este método fundamenta-se na redução bioquímica do corante resazurina (azul) para resorufina (rosada) ou dehidro-resorufina (trans-

¹ Recebido para publicação em 14/05/01. Aceito para publicação em 09/08/01.

² Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas. Rua Nilo Peçanha, 85. Centro. Vassouras-RJ. F.: (0xx24) 2471 1004. Ramal 233. E-mail: andsousa@ig.com.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

parente). Outras variações de coloração como marrom, pêssego, branco e púrpura também são consideradas positivas [16, 18].

As placas Petrifilm^R consistem de cartões de papel quadriculado revestido de polietileno recoberto com nutrientes desidratados e um gel hidrossolúvel a frio, protegido por um filme plástico superior transparente revestido internamente pelo mesmo gel e um corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Ao adicionar a amostra em teste os nutrientes se hidratam, o gel solidifica a mistura, e a placa está pronta para ser incubada [20]. O TTC é um corante amplamente utilizado em meios de cultura para a enumeração de bactérias, em amostras contendo interferentes. Os microrganismos vivos reduzem o TTC através de enzimas, originando formazano que fica acumulado no interior dos grânulos das células e se torna vermelho [2].

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a performance dos métodos disponíveis no mercado para a enumeração de aeróbios mesófilos como Simplate^R e Petrifilm^R, comparar estatisticamente os dados obtidos com os métodos convencionais e avaliar a capacidade de inibição do crescimento microbiano pelo TTC.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 60 amostras de sorvetes de marcas distintas que continham partículas (como pedaços de frutas), que pudessem interferir na interpretação/ leitura dos resultados.

2.1 – Preparo da amostra

Adicionaram-se 90mL de água peptonada 0,1%(p/v) estéril a 10g de amostra, previamente mantida a 4°C por no máximo 24h para descongelamento. A seguir, foram homogeneizadas e diluídas de acordo com as recomendações descritas pelo “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (American Public Health Association – APHA) [1]. As diluições das amostras foram selecionadas, baseando-se na contagem de microrganismos esperada para cada amostra.

2.2 – Contagem padrão em placas

A Contagem Padrão em Placas foi realizada de acordo com o preconizado pelo APHA [1]. Foram preparadas placas em duplicata, utilizando-se o PCA e incubação de 32°C/48h. Foram selecionadas placas com contagens entre 30-300 colônias. A contagem foi feita com o auxílio do contador Quebec.

2.3 – Contagem padrão em placas adicionando-se TTC

O procedimento adotado foi o mesmo descrito no item anterior, porém adicionou-se ao meio PCA 1mL de uma solução estoque estéril de TTC a 0,5%(p/v) para cada 100mL de meio [1]. Somente as colônias que reduziram o TTC (colônias vermelhas) foram consideradas nesta contagem.

2.4 – Contagem padrão em placas por Petrifilm^R AC

Placas, em duplicata de Petrifilm^R, foram inoculadas com 1mL de amostra, conforme recomendação do fabricante. A seguir, as placas foram incubadas com o lado transparente para cima em estufa a 32°C/48h. Selecionaram-se para a contagem as placas que continham entre 25-250 colônias. A contagem de colônias foi feita com o auxílio do contador Quebec.

2.5 – Contagem padrão em placas utilizando-se Simplate^R total plate count (TPC-CI)

Placas em duplicata de Simplate^R foram inoculadas com 1mL da amostra no centro da placa, adicionando-se em seguida, 9mL do meio de cultura previamente hidratado com água destilada estéril. O meio de cultura e a amostra foram distribuídos nas 84 cavidades, através de uma leve homogeneização. O excesso de líquido foi descartado através de uma esponja absorvente localizada na própria placa. As placas Simplate^R foram incubadas a 32°C/24h. Cavidades consideradas positivas foram contadas e o resultado comparado a uma tabela de NMP para conversão dos resultados. A mudança de cor do meio de azul para rosa e variações, foram consideradas positivas. A contagem máxima de cada placa é de 738 NMP/g [10].

2.6 – Análise estatística

Os resultados das contagens foram expressos através do logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra. Calculou-se o coeficiente de correlação (R) entre os quatro métodos; realizou-se a análise de variância e o teste de médias (Teste de Tukey), para avaliar diferenças significativas entre os mesmos.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 60 amostras analisadas, 47 foram consideradas na avaliação estatística, pois os resultados que excederam a mais alta diluição não foram incluídos na análise.

A *Figura 1* mostra a regressão linear dos dados da contagem padrão em placas plotados contra a contagem padrão em placas adicionada de TTC. O coeficiente de 0,948 demonstra uma alta correlação entre os dois métodos.

A *Figura 2* refere-se aos resultados obtidos quando confrontados os métodos Petrifilm^R e contagem padrão em placas com o TTC. Ambos os métodos apresentaram uma alta correlação (0,979). Conforme *Figura 3* os métodos Petrifilm^R e contagem padrão em placas apresentaram o coeficiente de correlação de 0,909. BLACKBURN *et al.* [4] testando vários alimentos encontraram um coeficiente de correlação entre estes dois métodos igual a 0,989. Coeficientes de correlação na faixa de 0,94-0,999 foram encontrados em estudos realizados por MCALLISTER *et al.* [12], CHAIN & FUNG [5] e CORMIER *et al.* [6]. PRATA *et al.* [14] encontraram um coeficiente

de correlação de 0,763 quando testaram amostras de leite pasteurizado.

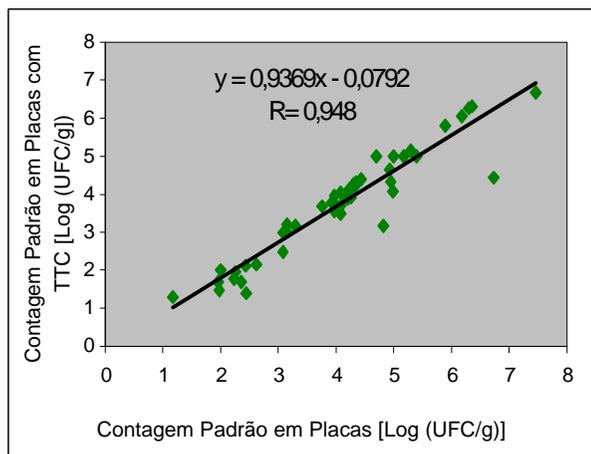


FIGURA 1. Correlação entre os métodos de contagem padrão em placas e contagem padrão em placas com TTC.

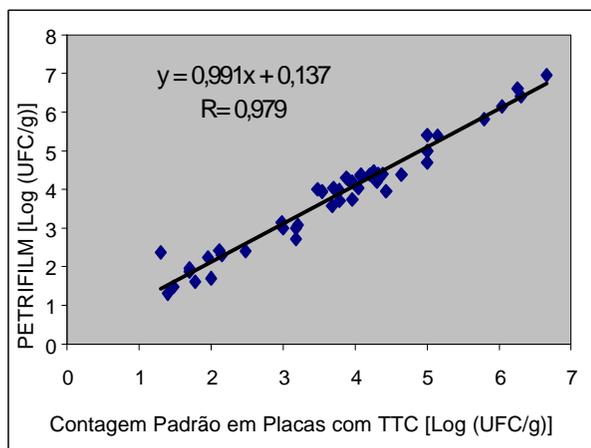


FIGURA 2. Correlação entre os métodos Petrifilm[®] e contagem padrão em placas com TTC.

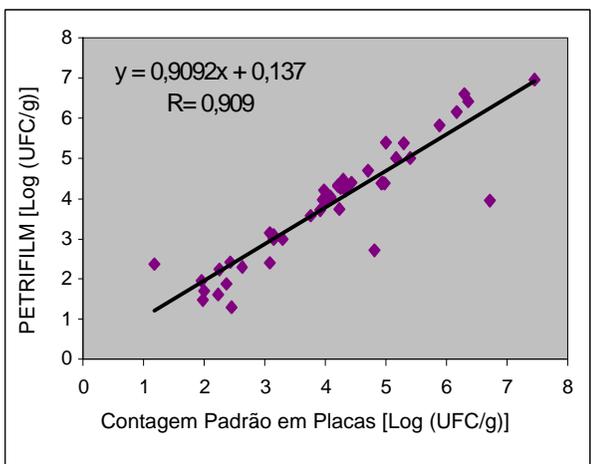


FIGURA 3. Correlação entre os métodos Petrifilm[®] e contagem padrão em placas.

Em relação ao método Simplate[®], quando comparado com a contagem padrão em placas, o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,884 (Figura 4). SMITH & TOWNSEND [17], analisando diversos alimentos encontraram coeficiente de correlação de 0,98. Ambos os resultados significam alta correlação entre as duas técnicas. NERO *et al.* [13], analisando amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, verificaram uma correlação de 0,9285 para leite tipo A, para leite tipo B de 0,9231 e para leite tipo C a correlação foi de 0,7209, sugerindo que o nível de contaminação do produto influencia diretamente o desempenho do método.

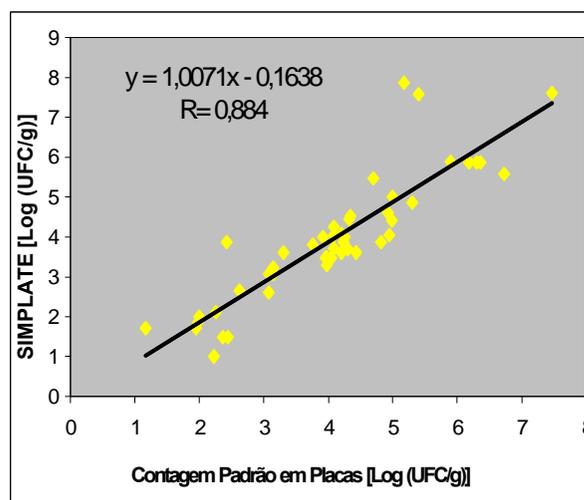


FIGURA 4. Correlação entre os métodos Simplate[®] e contagem padrão em placas.

Analisando os resultados obtidos quando comparou-se os métodos alternativos Petrifilm[®] e Simplate[®], o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,866 (Figura 5). Já TOWNSEND & SMITH [19] encontraram um coeficiente de correlação de 0,92.

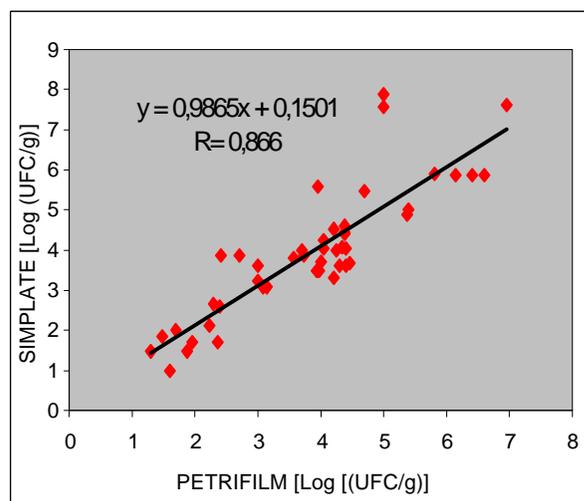


FIGURA 5. Correlação entre os métodos Simplate[®] e Petrifilm[®].

Em todos os casos analisados, os coeficientes de correlação encontrados em torno de 0,9 significa uma equi-

valente sensibilidade dos métodos testados. Entretanto, a análise da variância indicou a presença de diferença significativa entre os métodos, ao nível de 1% de significância. Portanto, realizou-se o teste de Turkey. A *Tabela 1* mostra que apenas a contagem padrão em placas com TTC diferiu significativamente da contagem padrão; não ocorrendo nenhuma outra diferença significativa entre os métodos. Os resultados deste trabalho corroboram os estudos realizados por BELOTTI, BARROS, NERO [3]. Ao pesquisarem amostras de leite pasteurizado os autores verificaram que 37,8% das colônias não reduziram o TTC, evidenciando que a adição do mesmo leva a resultados falsos negativos.

TABELA 1. Comparação entre os resultados das contagem de aeróbios mesófilos fornecidos por 4 métodos distintos, através do Teste de Tukey ao nível de 1% de significância.

Métodos	Contagem (Log UFC/g ou NMP/g)	Resultado do Teste de Tukey
Contagem padrão em placas	4,08 ± 1,37 ⁽¹⁾	A ⁽²⁾
Simplate	3,94 ± 1,56	AB
Petrifilm	3,84 ± 1,37	AB
Contagem padrão em placas com TTC	3,74 ± 1,36	B

⁽¹⁾ Média aritmética +\ - desvio padrão.

⁽²⁾ Letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre as médias, ao nível de 1% de probabilidade.

A principal vantagem das placas Petrifilm[®] em relação aos métodos convencionais é a sua conveniência: são prontas para uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessários, ocupam menos espaço em incubadoras, geladeiras, armários, autoclaves, têm descarte mais fácil, não quebram, não derramam, podem ser congeladas para contagem posterior ou reanálise [8].

Apesar de sua praticidade e sensibilidade, observou-se, freqüentemente nas placas Petrifilm[®] a liquefação do gel, dificultando a interpretação dos resultados. Estas mesmas observações foram feitas por CURIALE *et al.* [7], BLACKBURN *et al.* [4] e ROLIM *et al.* [15]. Outras limitações na utilização deste sistema podem ser apontadas: o tempo de leitura dos resultados é semelhante ao do método convencional e as bactérias lácticas e *Micrococcus* podem não ser detectados [20].

No Simplate[®], a ocorrência de reação positiva em todas as 84 cavidades, significa uma contagem de 738 microrganismos (Idexx). Isto, portanto, possibilita uma redução no número de diluições, o que é normalmente uma constante fonte de erro em uma análise microbiológica [9]. O seu tempo de incubação é reduzido, de 24 horas; o meio é adquirido esterilizado e pronto para uso, dispensando as etapas de preparo do meio de cultura, lavagem de vidrarias e esterilização; as partículas de alimento não são confundidas com colônias, o que reduz a subjetividade [10].

No Petrifilm[®] e no Simplate[®] não se observou a presença de colônias invasoras, ao contrário do que ocorreu nas placas de PCA.

Em relação ao custo, ambos os métodos são duas a três vezes mais caros do que o método convencional em placas. Deve-se no entanto, levar em consideração a relação custo/benefício.

4 – CONCLUSÕES

- Os resultados deste trabalho permitem concluir que: os sistemas Petrifilm[®] e Simplate[®] não apresentaram diferença significativa entre si, nem em relação aos demais métodos de contagem, podendo ser utilizados como uma alternativa tecnicamente viável para a contagem padrão em placa em amostras de sorvete.
- A adição de TTC ao “Plate Count Agar” para contagem de aeróbios mesófilos em sorvetes não é recomendada pois sua presença induz a falsos resultados negativos.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington, American Public Health Association, 1992. 1219 p.
- BELOTTI, Vanerli; BARROS, Márcia de A. F.; NERO, Luis A. Frequency of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 137-140, 1999.
- BELOTTI, Vanerli; BARROS, Márcia de A. F.; NERO, Luis A. Petrifilm[®] AC em leite pasteurizado: o porquê das contagens menores. **Indústria de Laticínios**. São Paulo, v. 5, n. 26, p. 50, mar./abr., 2000.
- BLACKBURN, C. W.; BAYLIS, C. L.; PETITT, S. B. Evaluation of Petrifilm[®] methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in a wide range of foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 137-140, 1996.
- CHAIN, V. S.; FUNG, D. Y. C. Comparison of Redigel[®], Petrifilm[®], Spiral Plate System[®], Isogrid[®] and aerobic plate count for determining the numbers of aerobic bacteria in selected foods. **Journal of Food Protection**, 54, p. 208-211, 1991.
- CORMIER, A.; CHIASSON, S.; LÉGER, A. Comparison of maceration and enumeration procedures for aerobic count in selected sea foods by standard method, Petrifilm[®], Redigel[®], and Isogrid[®]. **Journal of Food Protection**, 56, p. 249-251, 1993.
- CURIALE, Michael S.; SONS, Therese; MCALLISTER, J. Sue. Dry rehydratable film for enumeration of total aerobic bacteria in foods: collaborative study. **Journal of AOAC**, v. 73, n. 2, p. 242-248, 1990.
- FRANCO, Bernadette D. G. M.; BELOTTI, Vanerli. **Repetibilidade e reprodutibilidade**: importantes vantagens das placas Petrifilm[®] de contagem de microrganismos em alimentos. s. n. t.
- HAJDENWURCEL, Judith R.; SOUZA, Heloisa M. Avaliação do método Simplate[®] para contagem de coliformes totais e *E. Coli* em leite fluido. **Indústria de Laticínios**, . São Paulo, v. 3, n. 17, p. 71-77, set./out., 1998.
- IDEXX, Informe técnico. TOWSEND, D.E.; IRVING, R.; SMITH, K & NAQUI, A. A new test for the detection and

- quantification of the total coliform and *E. coli* concentration in food.
- [11] JAY, J. M. *Modern food microbiology*. 4. ed. New York, Chapman & Hall, 1992.
- [12] MCALLISTER, J. Sue; STADTHERR, M. P.; FOX, T. I. Evaluation of the Petrifilm[®] culture plate method for enumerating aerobic flora and coliforms in poultry processing facilities. **Journal of Food Protecting**, 51, p. 658-659, 1998.
- [13] NERO, Luís A.; BELOTTI, Vanerli; BARROS, Márcia de A. F. Desempenho do Simplate[®] Total Plate Count – color indicator (TPC-CI) para contagem de aeróbios mesófilos em diferentes tipos de leite pasteurizado. XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Fortaleza, CE, 8-10 de Agosto de 2000.
- [14] PRATA, L. F.; FIGUEIRA, M. A. D. T. Precisão da contagem total em Petrifilm[®] na discriminação de limites em leite pasteurizado. V CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS. VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, Águas de Lindóia, SP, 22-26 de Novembro de 1998.
- [15] ROLIM, H. M. V.; RABELO, M.; PEREIRA, A. S. Uso de placas Petrifilm[®] na avaliação microbiológica de corantes e/ou condimentos alimentares. V CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS. VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, Águas de Lindóia, SP, 22-26 de Novembro de 1998.
- [16] SMITH, C. F.; TOWNSEND, D. E. A new medium for determining the Total Plate Count in food. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 12, p. 1404-1410, 1999.
- [17] SMITH, C. F.; TOWNSEND, D. E. **Resazurin as indicator of growth in a new medium for measuring the aerobic plate count of food**. s. n. t.
- [18] TOWNSEND, D. E. Research institute approves Total Plate Count method. **Inside Laboratory Management**, p. 35-36, out., 1997.
- [19] TOWNSEND, D. E.; NAQUI, A. Comparison of Simplate[®] Total Plate Count test with plate count agar method for detection and quantification of bacteria in food. **Journal of A.O.A.C. International**, v. 81, n. 3, p. 563-569, 1998.
- [20] 3M DO BRASIL LTDA. **Petrifilm placa para contagem de aeróbios**; folheto de instrução de uso. USA, 1997.