

# 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<sup>1</sup>

M.P. SILVA<sup>2</sup>, D.R. CAVALLI<sup>2</sup>, T.C.R.M. OLIVEIRA<sup>2\*</sup>

## RESUMO

Coliformes fecais são definidos como coliformes capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 48 h a 45°C. *Escherichia coli*, juntamente com algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella*, podem apresentar essas características. Entretanto, apenas a presença de *Escherichia coli* em alimentos indica contaminação fecal por ser encontrada em grande quantidade no trato gastrointestinal do homem e animais de sangue quente, não sendo isolada normalmente em outros nichos. A denominação clássica de coliformes fecais foi alterada para coliformes a 45°C, na Resolução nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *E. coli* entre os coliformes a 45°C e comparar a eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *E. coli* em queijo Minas, lingüiça fresca, hortaliças e fubá. Petrifilm EC mostrou-se mais sensível na detecção de *E. coli* em relação ao método de tubos múltiplos, o qual apresentou resultados falso-negativos ou contagens subestimadas de *E. coli*, principalmente para amostras de alimentos de origem animal. Petrifilm EC foi o mais eficiente e prático, sendo um método alternativo adequado para a enumeração de coliformes totais e *E. coli* em alimentos.

**Palavras-chave:** coliformes totais, *E. coli*, Petrifilm, técnica dos tubos múltiplos.

## SUMMARY

COLIFORMS AT 45°C AND COMPARISON OF MOST PROBABLE NUMBER METHOD AND PETRIFILM EC FOR ENUMERATION OF TOTAL COLIFORMS AND *Escherichia coli* OF FOODS. Fecal coliforms are defined as coliforms that ferment lactose with gas production within 48 hours at 45°C. *Escherichia coli* and some strains of *Enterobacter* and *Klebsiella* show these same characteristics. However, only the presence of *E. coli* can indicate fecal contamination of foods, because it is abundantly found in the intestinal tract of all warm-blooded animals, including the humans, and it is not usually found in others niches. The classic denomination of fecal coliforms was changed to coliforms at 45°C in the Resolution nº 12/2001 of the National Surveillance Agency of Brazil. The objectives of this study were to analyse the presence of *E. coli* among the coliforms at 45°C and to compare the methods of Most Probable Number Method (MPN) and Petrifilm EC in their efficiency to detect *E. coli* in Minas cheese, sausage, fresh vegetables and corn flower samples. Petrifilm EC was more accurate method than MNP method, which presented false negative results or underestimation of *E. coli*. In conclusion, Petrifilm EC was an efficient and practical method to detect *E. coli*. Therefore, it may be alternatively used for enumeration of total coliforms and *E. coli* in foods.

**Keywords:** total coliforms, *E. coli*, Petrifilm, MNP method.

## 1 - INTRODUÇÃO

A denominação coliformes fecais foi utilizada durante muitos anos para descrever coliformes que fermentavam a lactose com produção de gás a 44,5°C. *Escherichia coli* e algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais [17]. *Klebsiella* e *Enterobacter* podem ser encontrados em outros ambientes, como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal [13]. Portanto, não é correta a relação direta da presença de coliformes termotolerantes em alimentos e água com contaminação de origem fecal, o que levou à necessidade de modificar, na legislação brasileira, a denominação coliformes fecais para coliformes a 45°C.

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 20/4/2005. Aceito para publicação em 28/4/2005 (001515)

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Londrina, Paraná Caixa Postal 6001 – CEP 86051-990

\*A quem a correspondência deve ser enviada

O Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) [9] adotou a denominação coliformes a 45°C, considerando os padrões “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes” como equivalentes a coliformes a 45°C.

Dados preliminares de um trabalho realizado no Laboratório de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, utilizando o método de tubos múltiplos, mostraram que *E. coli* não foi isolada de uma grande percentagem de alimentos contaminados com coliformes a 45°C, e a identificação bioquímica de *E. coli* foi necessária para a confirmação de contaminação fecal [12]. Nesse trabalho, embora 16 (80%) das 20 amostras analisadas apresentassem coliformes a 45°C, *E. coli* foi isolada em apenas cinco amostras (31,1%). Além disso, para vários alimentos a pesquisa de coliformes a 45°C apenas aumentou o tempo de análise, não acrescentando informação sobre as condições sanitárias do produto analisado.

As análises microbiológicas tradicionais empregadas no controle de qualidade de alimentos foram desenvolvidas

no final do século XIX e vêm sendo utilizadas até hoje [31]. Porém, esses métodos requerem grande disponibilidade de tempo e excessivo trabalho laboratorial.

Durante mais de duas décadas, os métodos rápidos têm sido desenvolvidos com o objetivo de substituir a metodologia tradicional, oferecendo resultados mais rápidos e sensíveis, aumentando a produtividade do laboratório [26].

Um dos métodos rápidos mais utilizados para detecção de coliformes totais e *E. coli* em alimentos é o Petrifilm EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA). Alguns países como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Coreia, Portugal, Noruega, Itália, entre outros, desenvolveram trabalhos e estudos colaborativos para avaliar a eficiência das placas Petrifilm e de outros métodos rápidos em relação aos métodos convencionais [6, 7, 8, 11, 16, 19, 23, 24, 29].

Poucos trabalhos foram realizados no Brasil comparando as placas Petrifilm com as técnicas convencionais. Placas Petrifilm EC e HS mostraram ser valiosas e práticas na pesquisa da qualidade da água de abastecimento e de efluentes da Ilha do Mel, Paraná, principalmente, quando o método tradicional, ou mesmo outros métodos rápidos que utilizam tubos, não podem ser utilizados [3].

Por outro lado, BELOTI *et al.* [4], analisando amostras de leite tipo A, B e C comercializados no Brasil, encontraram resultados similares aos da técnica convencional apenas com as amostras de leite tipo A e B, sugerindo que a microbiota contaminante presente no leite tipo C não pode ser detectada pelo método Petrifilm AC na sua totalidade. Anteriormente, BELOTI *et al.* [5] já haviam relatado que uma alta percentagem de microorganismos encontrados em leite pasteurizado, produzido em diferentes regiões do Brasil, não pode ser detectada por meio de técnicas laboratoriais baseadas na redução do cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio, indicador utilizado em diferentes placas Petrifilm.

Portanto, trabalhos testando diferentes grupos de alimentos e diferentes placas Petrifilm precisam ser realizados no Brasil para que este método prático e rápido possa substituir com segurança a técnica convencional.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *E. coli* entre os coliformes a 45°C e comparar a eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *E. coli* em alguns alimentos de origem animal e vegetal.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Amostras

Um total de 135 amostras de diferentes alimentos de origem animal (lingüiça frescal e queijo minas frescal) e vegetal (hortaliças e fubá) foram obtidos em feiras livres da cidade de Londrina (PR), de fevereiro de 2003 a fevereiro de 2004. As coletas foram feitas semanalmente, no período da manhã, em bancas aleatórias. Alíquotas de 100 g de cada amostra foram coletadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em recipientes isotérmicos até o laboratório.

O tempo transcorrido entre a coleta e a análise laboratorial foi de, no máximo, 2 h após a coleta.

### 2.2 - Preparo de amostras

Alíquotas de 25 g de cada amostra de alimento foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada durante 1 min. (Seward Stomacher 400 Lab System, Inglaterra). Diluições decimais a partir da diluição  $10^{-1}$  foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%.

### 2.3 - Técnica dos tubos múltiplos

Para todas as amostras de alimentos analisadas, a determinação do número mais provável de coliformes pelo método dos tubos múltiplos foi realizada utilizando Caldo Lauril Sulfato de Sódio-CLS (Biobrás S.A., Montes Claros, Minas Gerais, Brasil) e Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante-CLBVB (Biobrás S.A.). Para determinação de coliformes a 45°C foi empregado Caldo E.C. (Biobrás S.A.). Alíquotas de 1,0 mL de cada diluição, preparadas conforme Item 2.2, foram transferidas para séries de três tubos contendo CLS com tubos de Durham invertidos. Os tubos foram incubados a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 e 48 h, e uma alçada de cada tubo apresentando crescimento e produção de gás foi semeada em tubos contendo 10 mL de CLBVB e E.C., com tubos de Durham invertidos.

Os tubos contendo CLBVB foram incubados a 35°C por 24 e 48 h, enquanto tubos de E.C. foram incubados por 24 e 48 h a 45°C em banho Maria. A formação de gás nos tubos de CLBVB indicou a presença de coliformes totais, sendo o resultado expresso em NMP de coliformes totais por grama de alimentos. Para contagem de *E. coli*, os tubos de E.C. com gás foram repicados para placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno-EMB (Merck, São Paulo, São Paulo, Brasil) e incubadas a 35°C. Após 24 h, colônias negras com ou sem brilho metálico, suspeitas de *E. coli*, foram identificadas bioquimicamente. As placas de EMB positivas para *E. coli*, correspondentes aos tubos de EC positivos com gás, foram consideradas para o cálculo de *E. coli* por grama de alimento.

### 2.4 - Identificação bioquímica de *Escherichia coli*

A identificação bioquímica de *E. coli* foi realizada utilizando-se as provas de Tríplice Ágar Ferro, Citrato de Simmons, Indol, Vermelho de Metila e Teste de Voges-Proskauer [32].

### 2.5 - Sistema Petrifilm™

Placas Petrifilm™ EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA) foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diferentes diluições dos alimentos, preparadas conforme Item 2.2, seguindo as instruções do fabricante. Após incubação das placas a 35°C por 24 e 48 h, colônias azuis e vermelhas com

bolhas foram consideradas colônias de *E. coli* e coliformes totais, respectivamente. O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expresso em UFC/g. Para confirmação de *E. coli*, colônias azuis com bolhas de gás foram submetidas às provas bioquímicas, descritas no Item 2.4.

## 2.6 - Análise estatística

Os resultados das contagens de coliformes totais e *E. coli* foram convertidos em  $\log_{10}$ . Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, empregando-se o programa ORIGIN, para determinar a correlação entre os dados dos diferentes grupos de alimentos. [6, 28, 29, 33].

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 - Avaliação da presença de *E. coli* entre os coliformes a 45°C

A Tabela 1 apresenta o número de amostras positivas pela técnica dos tubos múltiplos das 135 amostras de alimentos analisadas quanto à presença de coliformes a 45°C e *E. coli*. Embora 42 amostras (31,1%) apresentassem coliformes a 45°C, *E. coli* foi isolada em 25 (18,5%) amostras.

**TABELA 1** – Número de amostras positivas pela técnica dos tubos múltiplos com amostras de queijo, hortaliça, lingüiça e fubá quanto à presença de coliformes a 45°C e *E. coli*

Amostras	Nº total de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para Coliformes a 45°C	Nº de amostras positivas para <i>E. coli</i>
Queijo frescal	28	9	5
Hortaliças	26	7	0
Lingüiça	56	26	20
Fubá	25	0	0
Total	135	42	25

Nenhuma das amostras de fubá analisadas apresentou coliformes a 45°C e, conseqüentemente, *E. coli*.

As sete amostras de hortaliças (26,9%) positivas para coliformes a 45°C apresentaram contagens acima do valor preconizado pela legislação brasileira ( $10^2$  NMP por grama). Entretanto, em nenhuma das amostras *E. coli* foi isolada. Assim sendo, essas sete amostras seriam consideradas impróprias para o consumo humano sem apresentar contaminação de origem fecal, uma vez que somente a presença de *E. coli* indica contaminação por fezes [25].

Das 28 amostras de queijo analisadas, nove (32,1%) apresentavam contagens de coliformes a 45°C e dessas, cinco (17,9%) estavam acima do padrão preconizado pela legislação brasileira ( $5 \times 10^3$  NMP/g) (Tabela 2). Na amostra de número 19, não foi detectado *E. coli*, porém, a amostra seria considerada imprópria para consumo pela legislação brasileira por apresentar contagem de coliformes a 45°C acima do padrão (Tabela 2).

**TABELA 2** – Contagens de coliformes a 45°C e de *E. coli* das amostras de queijo positivas pela técnica dos tubos múltiplos

Amostras queijo	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
1	$2,3 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^3$
2	$2,4 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$
4	$4,3 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^5$
19	$9,0 \cdot 10^3$	Ausente
11	$7,0 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$
9	$3,0 \cdot 10^3$	Ausente
13	$3,0 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
5	$4,0 \cdot 10^3$	Ausente
16	$4,0 \cdot 10^2$	Ausente

Em relação aos resultados obtidos com as análises de lingüiça, das 56 amostras analisadas 26 (46,43%) foram positivas para coliformes a 45°C e dessas 20 (35,71%) apresentavam *E. coli* (Tabela 1). Das 26 amostras positivas para coliformes a 45°C, 13 (23,21%) apresentavam contagens acima do preconizado pela legislação brasileira ( $5 \times 10^3$  NMP/g) e todas foram positivas para *E. coli* (Tabela 3).

**TABELA 3** – Contagens de coliformes a 45°C e de *E. coli* das amostras de lingüiça que estavam acima do padrão preconizado pela legislação brasileira

Amostras lingüiça	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
2	$9,3 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^4$
3	$7,0 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^4$
5	$2,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$
9	$4,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^4$
10	$4,6 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^2$
17	$2,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^4$
36	$2,4 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^3$
40	$7,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^4$
41	$9,3 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^2$
43	$7,0 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^2$
44	$3,0 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^2$
46	$2,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^3$
49	$2,3 \cdot 10^4$	$9,3 \cdot 10^3$

Se for considerado que a legislação brasileira utiliza coliformes a 45°C como equivalente à denominação coliformes de origem fecal, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a utilização deste padrão para alimentos de origem animal parece levar a erros menores de interpretação que os encontrados na análise de hortaliças.

Em 1996, nos Estados Unidos, a divulgação na mídia de notícias sobre chá contaminado com coliformes fecais gerou uma polêmica histórica, que levou à discussão do uso desta terminologia na análise de alimentos. Na época, o chá passou a ser considerado um perigo para a saúde, por estar contaminado com fezes, e várias cadeias de restaurantes impediram a sua venda.

A Universidade da Georgia detectou cepas termotolerantes de *Klebsiella* e *Enterobacter* em várias amostras de chá analisadas, não encontrando amostra contaminada por

*E. coli* [13]. Mais tarde, BRODSKY [10] sugeriu a extinção do termo coliformes fecais da microbiologia.

Além do padrão coliformes a 45°C não indicar contaminação fecal [25, 27], resultados encontrados no presente trabalho mostram que a análise deste grupo precisa ser discutida em relação ao custo benefício para alguns grupos de alimentos. Os resultados obtidos com hortaliças para coliformes a 45°C, por exemplo, não acrescentaram nenhuma informação àquela fornecida pelo CLBVB.

Assim sendo, a sugestão apresentada no *Bacteriological analytical manual online* do *Center for Food Safety & Applied Nutrition* – 2002, poderia ser discutida pelos órgãos competentes do Brasil para uma mudança futura da legislação brasileira. Neste manual, os três padrões são utilizados em diferentes aplicações.

O grupo coliformes totais é utilizado como indicador da potabilidade da água e como indicador geral das condições higiênico-sanitárias do ambiente de processamento de alimentos. A contagem de coliformes fecais continua a ser um padrão de escolha para a análise de frutos do mar e da água na qual esses alimentos são cultivados. A contagem de *E. coli* é utilizada como indicador de contaminação fecal recente ou de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias de processamento de alimentos [15].

Resultados obtidos durante a comparação da técnica tradicional de tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de *E. coli*, que serão apresentados a seguir, também reafirmam a necessidade da reavaliação do padrão coliformes a 45°C, na análise de alimentos.

### 3.2 - Comparação da eficiência do Petrifilm EC para detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em relação à técnica convencional dos tubos múltiplos

A comparação entre a técnica convencional de tubos múltiplos e o Petrifilm EC para detecção de coliformes totais foi realizada para hortaliças, queijo, fubá e lingüiça frescal.

Das 25 amostras de fubá analisadas, 12 (48%) apresentaram coliformes totais tanto pela técnica dos tubos múltiplos quanto pelo Petrifilm EC, porém, com um coeficiente de correlação muito baixo. Neste caso, um número maior de amostras, como também, diferentes tipos de farinha precisam ser analisadas para que essa baixa correlação possa ser explicada.

Coliformes totais foram detectados pelos dois métodos nas 26 amostras de hortaliças com um coeficiente de correlação de 0,76 (Figura 1). Em sete amostras (26,92%), coliformes a 45°C foram isolados pelo método dos tubos múltiplos com contagens acima do valor preconizado pela legislação brasileira. Porém, como o Petrifilm não detecta coliformes a 45°C, e em nenhuma das amostras foi isolada *E. coli*, não foi possível comparar a eficiência das duas metodologias para estes padrões.

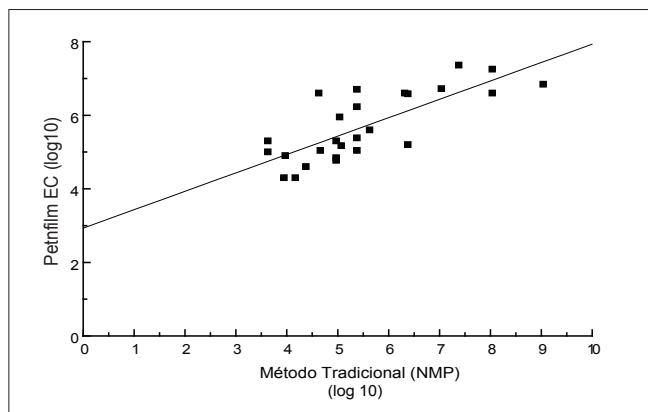


FIGURA 1 – Dispersão dos resultados da contagem de coliformes totais em amostras de hortaliças utilizando Petrifilm EC e a técnica dos tubos múltiplos (R:0,76)

O coeficiente de correlação entre os dados obtidos com os tubos múltiplos e o Petrifilm EC para enumeração de coliformes totais nas amostras de queijo e lingüiça foi de 0,77 e 0,79, respectivamente (Figuras 2 e 3). Outros trabalhos já foram publicados analisando a eficiência desses dois métodos para a contagem de coliformes totais. NELSON *et al.* [22] obtiveram um coeficiente de correlação de 0,90, superior ao obtido neste trabalho, ao analisarem amostras de leite cru. MATNER *et al.* [20] encontraram resultados equivalentes entre Petrifilm EC e tubos múltiplos quando avaliaram amostras de queijo, carne de aves e vegetais.

Por outro lado, EVANS *et al.* [14] verificaram resultados falso-negativos para coliformes ao empregarem o método dos tubos múltiplos na análise de água potável e não potável. Entre as amostras analisadas, mais de 80% foram negativas, porém, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.* e até mesmo *E. coli* foram recuperados por outros métodos, concluindo que o método dos tubos múltiplos pode fornecer resultados falsos sobre a qualidade da água.

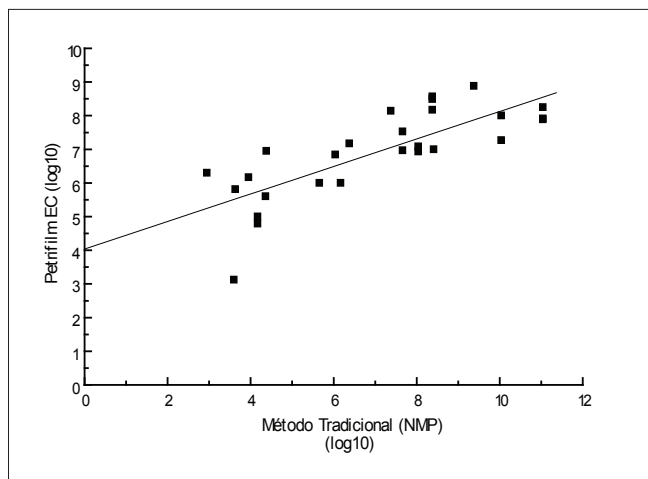
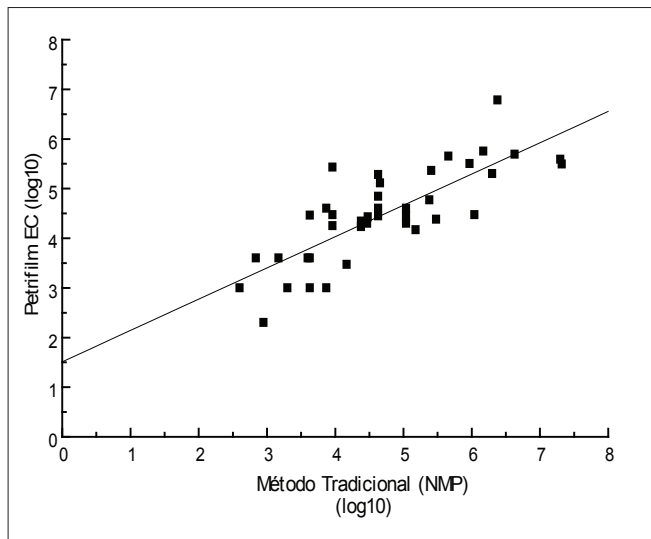


FIGURA 2 – Dispersão dos resultados da contagem de coliformes totais em amostras de queijo frescal utilizando Petrifilm EC e a técnica dos tubos múltiplos (R:0,77)



**FIGURA 3** – Dispersão dos resultados da contagem de coliformes totais em amostras de lingüiça fresca utilizando Petrifilm EC e a técnica convencional dos tubos múltiplos. (R:0,79)

Nas duas metodologias utilizadas *E. coli* não foi isolada de nenhuma das amostras de hortaliças e fubá analisadas. Por essa razão, a avaliação da eficiência dos tubos múltiplos e Petrifilm EC para a detecção de *E. coli* foi feita para queijo e lingüiça.

A Resolução nº 12 da Anvisa não estabelece limite máximo para contagens de *E. coli*. Portanto, as amostras de alimentos são consideradas impróprias para consumo, devido a possível contaminação fecal, pela contagem de coliformes a 45°C.

Das 28 amostras de queijo analisadas neste trabalho, em 24 (85,7%) os resultados obtidos com os dois métodos utilizados foram coincidentes, ou seja, independente do método utilizado não haveria erro na avaliação das condições higiênico-sanitárias desse produto. Em quatro amostras (14,3%) as contagens foram divergentes (dados não apresentados).

Considerando como limite máximo para *E. coli* o mesmo estabelecido pela Resolução nº 12 da Anvisa para coliformes a 45°C, duas amostras de queijo seriam consideradas impróprias para consumo pela técnica de tubos múltiplos e adequadas pelo Petrifilm EC. O contrário seria considerado para as outras duas amostras. Infelizmente, como o número de amostras positivas para *E. coli* foi insuficiente, não foi possível fazer a correlação entres os dados obtidos pelos tubos múltiplos e Petrifilm EC para determinação de *E. coli* em queijo.

Das 56 amostras de lingüiça analisadas, em 37 (66,0%) os resultados obtidos pelos dois métodos foram coincidentes e não levariam ao erro na avaliação das condições higiênico-sanitárias. Considerando como limite máximo para *E. coli* no Petrifilm o mesmo estabelecido para coliformes a 45°C, como foi feito para a análise dos resultados obtidos com as amostras de queijo, 13 amostras de lingüiça consideradas

adequadas para o consumo humano pelos tubos múltiplos seriam condenadas pelo Petrifilm EC (Tabela 4).

**TABELA 4** – Contagens de coliformes a 45°C pela técnica de tubos múltiplos e de *E. coli* pelo Petrifilm EC mostrando os resultados divergentes obtidos em 13 amostras de lingüiça

Amostras lingüiça	Coliformes a 45°C tubos múltiplos (NMP/g)*	<i>E. coli</i> Petrifilm (UFC/g)
18	9,0.10 <sup>2</sup>	1,0.10 <sup>4</sup>
42	1,1.10 <sup>3</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>
37	2,8.10 <sup>3</sup>	6,0.10 <sup>3</sup>
38	7,0.10 <sup>2</sup>	1,3.10 <sup>4</sup>
45	2,3.10 <sup>3</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>
39	3,0.10 <sup>2</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>
4	Ausente	1,0.10 <sup>5</sup>
14	Ausente	2,0.10 <sup>4</sup>
15	Ausente	2,0.10 <sup>4</sup>
47	Ausente	3,7.10 <sup>4</sup>
48	Ausente	2,8.10 <sup>4</sup>
25	Ausente	7,3.10 <sup>3</sup>
26	Ausente	6,0.10 <sup>3</sup>

\*Limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para coliformes a 45°C: 5x10<sup>3</sup>/g

Fazendo essa mesma comparação com as contagens obtidas para *E. coli* nos dois métodos e considerando como limite máximo o mesmo estabelecido para coliformes a 45°C, os resultados seriam ainda mais divergentes. Nesse caso, 19 amostras seriam consideradas impróprias para consumo pelo Petrifilm EC, porém, adequadas pela técnica dos tubos múltiplos (Tabela 5). Além disso, no Petrifilm EC as contagens de *E. coli* foram superiores às estimadas pelos tubos múltiplos.

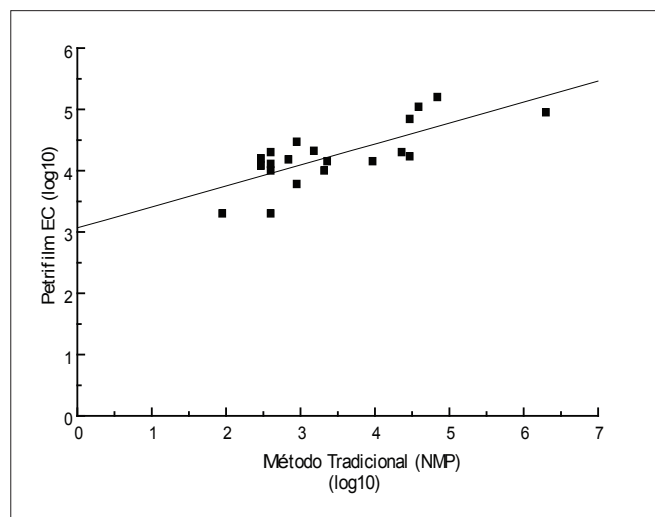
**TABELA 5** – Contagens de *E. coli* pelos tubos múltiplos e Petrifilm EC mostrando os resultados divergentes obtidos em 19 amostras de lingüiça, considerando o limite máximo para coliformes a 45°C estabelecido pela legislação brasileira

Amostras lingüiça	<i>E. coli</i> tubos múltiplos(NMP/g)*	<i>E. coli</i> Petrifilm (UFC/g)
4	Ausente	1,0.10 <sup>5</sup>
14	Ausente	2,0.10 <sup>4</sup>
15	Ausente	2,0.10 <sup>4</sup>
25	Ausente	7,3.10 <sup>3</sup>
26	Ausente	6,0.10 <sup>3</sup>
39	Ausente	1,2.10 <sup>4</sup>
47	Ausente	3,7.10 <sup>4</sup>
48	Ausente	2,8.10 <sup>4</sup>
10	9,0.10 <sup>2</sup>	3,0.10 <sup>4</sup>
36	2,1.10 <sup>3</sup>	1,0.10 <sup>4</sup>
41	4,0.10 <sup>2</sup>	2,0.10 <sup>4</sup>
43	3,0.10 <sup>2</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>
44	7,0.10 <sup>2</sup>	1,5.10 <sup>4</sup>
46	1,5.10 <sup>3</sup>	2,1.10 <sup>4</sup>
18	4,0.10 <sup>2</sup>	1,0.10 <sup>4</sup>
42	3,0.10 <sup>2</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>
37	9,0.10 <sup>2</sup>	6,0.10 <sup>3</sup>
38	4,0.10 <sup>2</sup>	1,3.10 <sup>4</sup>
45	2,3.10 <sup>3</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>

\*Limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para coliformes a 45°C: 5x10<sup>3</sup>/g

O maior isolamento de *E. coli* nas placas Petrifilm foi também verificado por LINTON *et al.* [19], que consideraram as placas Petrifilm uma boa alternativa para a detecção de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes e *E. coli* em amostras de carne. A validação do Petrifilm EC como método oficial para contagem de coliformes e *E. coli* em alimentos pela *Association Official Analytical Chemists* (AOAC 991.14), também confirma a eficiência deste método de análise.

RUSSEL [29] avaliou a técnica dos tubos múltiplos e os métodos Petrifilm EC, Simplate e condutância na detecção de *E. coli* em alimentos. Esse autor obteve coeficientes de correlação entre o método tradicional e Petrifilm EC de 0,95 e 0,93 para enumeração de *E. coli* em carnes de frango e de boi, respectivamente. Neste trabalho o coeficiente de correlação de 0,75, obtido para amostras de lingüiça, foi menor, considerando somente as amostras positivas para *E. coli* nos dois métodos (Figura 4).



**FIGURA 4** – Dispersão dos resultados da contagem de *E. coli* em amostras de lingüiça frescal utilizando Petrifilm EC e a técnica dos tubos múltiplos (R:0,75)

É importante ressaltar que 11 amostras de lingüiça não apresentaram *E. coli* pelo método dos tubos múltiplos, porém, foram detectadas pelo Petrifilm EC (Tabela 6). Essas amostras não foram utilizadas para determinação do coeficiente de correlação entre os métodos citados.

Das 11 amostras que apresentaram contagens de *E. coli* somente pelo Petrifilm EC, oito estavam acima do valor preconizado pela legislação, indicando, mais uma vez, a divergência entre os métodos (Tabela 6).

Os resultados evidenciaram que, principalmente nos alimentos de origem animal, o método tradicional de tubos múltiplos não detectou *E. coli* em muitas amostras ou as contagens estimadas foram superiores no Petrifilm EC. Além disso, a técnica dos tubos múltiplos tem as desvantagens de ser trabalhosa, levar até uma semana para fornecer resultados e necessitar de grandes quantidades de vidraria e meios de cultura [2].

**TABELA 6** – Resultados das análises de lingüiça com contagens de *E. coli* somente pelo Petrifilm EC, considerando o limite máximo para *E. coli* equivalente a coliformes a 45°C

Amostras lingüiça	<i>E. coli</i> tubos múltiplos (NMP/g)*	<i>E. coli</i> Petrifilm (UFC/g)
4	Ausente	1,0.10 <sup>5</sup>
14	Ausente	2,0.10 <sup>4</sup>
15	Ausente	2,0.10 <sup>4</sup>
25	Ausente	7,3.10 <sup>3</sup>
26	Ausente	6,0.10 <sup>3</sup>
39	Ausente	1,2.10 <sup>4</sup>
47	Ausente	3,7.10 <sup>4</sup>
48	Ausente	2,8.10 <sup>4</sup>
22	Ausente	1,0.10 <sup>3</sup>
27	Ausente	1,0.10 <sup>3</sup>
50	Ausente	3,0.10 <sup>3</sup>

\*Limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para coliformes a 45°C: 5x10<sup>5</sup>/g

A técnica de tubos múltiplos já foi criticada por fornecer resultados errôneos nas diferentes etapas da metodologia [1, 14]. Apesar de ser considerado método padrão, está sujeito a vários tipos de interferências, tais como, presença de bactérias antagonistas e de inibidores naturais do meio seletivo, uso de alta temperatura de incubação e competição entre bactérias não coliformes por lactose. Esses fatores podem levar a não detecção ou detecção subestimada de *E. coli* [8, 14, 21], o que explicaria os resultados obtidos com as amostras de lingüiça analisadas neste trabalho.

Outra possibilidade seria a interferência da matriz alimentar, já que a divergência nas contagens de *E. coli* ocorreu com as amostras de lingüiça. Embora não tenha sido possível saber quais os temperos utilizados na fabricação da lingüiça, esses ingredientes podem ter prejudicado o crescimento de *E. coli* nos meios seletivos empregados nos tubos múltiplos.

Das 11 amostras de lingüiça nas quais *E. coli* não foi detectada pelos tubos múltiplos, em 10 (90,90%) havia ausência de produção de gás no caldo EC. A ausência de gás no caldo EC pode estar relacionada à presença de bactérias não coliformes que competem pela lactose, levando à produção insuficiente de gás, o qual não seria detectado nos tubos de Durham [14].

Bactérias antagonistas, como *P. aeruginosa*, podem estar presentes em alimentos de origem animal refrigerado inibindo ou dificultando o crescimento de *E. coli* [14]. Outro fator a ser considerado é a atividade da enzima formiase, responsável pela produção de gás, que pode ser inibida em meios de cultura com pH levemente ácido ou alcalino. Quando alimentos muito contaminados são cultivados em meio contendo lactose, mesmo havendo utilização deste açúcar, o pH pode permanecer próximo da neutralidade devido ao tamponamento que pode ocorrer pela degradação de peptonas presentes no meio [14, 18].

Alta temperatura e substâncias tais como, sais biliares e trifetil metano do verde brilhante, utilizadas para inibir

microbiota competitiva nos meios seletivos para coliformes, podem também inibir o crescimento de *E. coli*. MEADOWS *et al.* [21] verificaram que a ação individual ou a interação entre esses fatores provocaram mais de 90% de inibição no crescimento e produção de gás por *E. coli*. Da mesma forma SCHEUSNER *et al.* [30], ao submeterem culturas de células injuriadas de *E. coli* ao corante verde brilhante, verificaram que o corante inibiu o crescimento das células injuriadas, mesmo após enriquecimento, concluindo que o meio Verde Brilhante não é adequado para enumeração de *E. coli*.

#### 4 - CONCLUSÕES

A presença de coliformes a 45°C não prova, necessariamente, contaminação de origem fecal. Esse padrão precisa ser reavaliado, abrindo uma discussão urgente sobre a necessidade de se analisar a presença de coliformes a 45°C em alimentos.

Petrifilm EC e o método convencional dos tubos múltiplos foram eficientes para a determinação de coliformes totais nas amostras de alimentos analisadas. Porém, a técnica dos tubos múltiplos apresentou resultados falso-negativos para *E. coli* ou, em algumas amostras de alimentos de origem animal, contagens estimadas inferiores ao Petrifilm EC.

Petrifilm EC mostrou-se sensível e eficiente para detecção de *E. coli* em alimentos, além de apresentar vantagens, tais como, rapidez na obtenção de resultados, praticidade na execução e na contagem de colônias e possibilidade de identificação bioquímica complementar no máximo 48 h após incubação.

#### 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSON, J.G.; MEADOWS, P.S.; MULLINS, B.W.; PATEL K. Gas production by *E. coli* in selective lactose fermentation media. **FEMS Microbiology Letters**, v. 8, p. 17-21, 1980.
- [2] BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A.; CORNAX, R.; BORREGO, J.J.; TORREGROSSA, V.M.; GAUTHIER, M.J. Modified most probable number technique for the specific determination of *E. coli* from environmental samples using a fluorogenic method. **Journal of Microbiology Method**, v. 12, n. 3-4, p. 235-245, 1990.
- [3] BELOTI, V.; FREIRE, R.L.; PACHEMSHY, J.S.; NERO, L.A.; MORAES, L.B.; MATTOS, M.R.; GUSMÃO, V.V.; BARROS, M.A.F. Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* em água de abastecimento e de efluentes da Ilha do Mel (PR), utilizando-se placas Petrifilm EC e HS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 95, p. 48-52, 2002.
- [4] BELOTI, V. Fatores que podem influenciar o desempenho de métodos rápidos para enumeração de microorganismos indicadores de higiene em leite pasteurizado. São Paulo, 2000, p. 86. Tese (doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).
- [5] BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FREITAS, J.C.; NERO, L.A.; SOUZA, J.A.; SANTANA, E.H.W.; FRANCO, B.G.M. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 137-140, 1999.
- [6] BEUCHAT, L.R.; COPELAND, F.; CURIALE, M.S.; DANISAVICH, T.; GANGAR, V.; KING, B.W.; LAWLIS, T.L.; LIKIN, R.O.; OKWUSOA, J. SMITH, C.F.; TOWNSEND, D.E. Comparison of the Simplate total plate count method with Petrifilm, Redigel and conventional pour plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 14-18, 1998.
- [7] BREDIE, W.L.P.; BOER, E. Evaluation of the MNP, Anderson-Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *E. coli* in foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 197-208, 1992.
- [8] BLOCH, N.; SIDJABAT-TAMBUNAN, H.; TRATT, T.; BENSINK, J.; LEA, K.; FROST, A.J. The enumeration of coliforms and *E. coli* on naturally contaminated beef: A comparison of the Petrifilm method with the Australian Standard. **Meat Science**, v. 43, n. 2, p. 187-193, 1996.
- [9] BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/1201rdc>. Acesso em: 16 ago. 2002.
- [10] BRODSKY, M.H. Abolition of the term "fecal coliforms" seconded. **ASM News**, v. 63, n. 7, p. 345-346, 1997.
- [11] CURIALE, M.S.; SONS, T.; MCIVER, D.; MCALLISTER, J.S.; HALSEY, B.; ROBLER, D.; FOX, T.L. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *E. coli* in foods: Collaborative Study. **Journal of Association Official Analytical Chemists**, v. 74, n. 4, p. 635-648, 1991.
- [12] DORO, D.L.; SILVA, M.P.; COSER, S.; MURAOKA, J.Y.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Isolamento de *E. coli* entre os coliformes fermentadores de lactose com produção de gás a 44,5°C. Anais, XXI Congresso de Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, p. 371, 2001.
- [13] DOYLE, M.P. Fecal coliforms in tea: what's problem? **Food Technology**, Back page, 1996.
- [14] EVANS, T.M.; WAARVICK, C.E.; SEIDDER, R. J.; LeCHEVALLIER, M.W. Failure of the most probable number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 130-138, 1981.
- [15] FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. **Bacteriological analytical manual online**, v. 4, p. 1-14, 2002. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>. Acesso em: 7 de abr. 2004.
- [16] GANGAR, V.; CURIALE, M.; LINDBERG, K.; GAMBREL-LENARZ, S.G. Dry rehydratable film method for enumerating confirmed *E. coli* in poultry, meats and seafood: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 1, p. 73-78, 1999.
- [17] GUIDELINES FOR CANADIAN WATER QUALITY. Bacteriological quality. Disponível em: [http://hc.sc.gc.ca/hecs.sesc/water/publications/drinking\\_water\\_quality\\_guidelines/ch3.htm](http://hc.sc.gc.ca/hecs.sesc/water/publications/drinking_water_quality_guidelines/ch3.htm). Acesso em: 18 fev. 2004.
- [18] KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr, W.C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 6ª ed., Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers, p. 183, 1997.

- [19] LINTON, R.H.; EISEL, W.G.; MURIANA, P.M. Comparison of Conventional Plating methods and Petrifilm for the recovery of microorganisms in a ground beef processing facility. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1.084-1.088, 1997.
- [20] MATNER, R.R.; FOX, T.L.; MCIVER, D. Efficacy of Petrifilm E. coli count plates for E. coli and coliform enumeration. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 2, p. 145-150, 1990.
- [21] MEADOWS, P.S.; ANDERSON, J.G.; PATEL K. Synergistic inhibition of E. coli growth and gas production in selective media. **FEMS Microbiology Letters**, v. 8, p. 215-219, 1980.
- [22] NELSON, C.L.; FOX, T.L.; BUSTA, F.F. Evaluation of dry medium film Petrifilm for coliform enumeration. **Journal of Food Protection**, v. 4, n. 7, p. 520-525, 1984.
- [23] OGDEN, I.D.; BROWN, G.C.; GALLACHER, S.; GARTHWAITE, P.H.; GENNARI, M.; PILAR GONZALEZ, M.; JØRGENSEN, L.B.; LUNESTAD, B.T.; MACRAE, M.; CELESTE NUNES, M.; PETERSEN, A.C.; ROSNES, J.T.; VLIEGENTHART, J. An interlaboratory study to find an alternative to the MNP technique for enumerating E. coli in shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 57-64, 1998.
- [24] PARK, Y.H.; SEO, K.S.; AHN, J.S.; YOO, H.S.; KIM, S.P. Evaluation of the Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retail meat samples. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1.841-1.843, 2001.
- [25] POWELL, J.C.; MOORE, A.R.; GOW, J.A. Comparison of EC broth and Medium A-1 for the recovery of E. coli from frozen shucked snow crab. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 836-840, 1979.
- [26] PRIEGO, R.; MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Evaluation of Petrifilm series 2000 as a possible rapid method to count coliforms in foods. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p. 1.137-1.140, 2000.
- [27] RAJ, H.; LISTON, J. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. **Applied Microbiology**, v. 9, p. 171-174, 1961.
- [28] RESTAINO, L.; LYON, R.H. Efficacy of Petrifilm VRB for enumerating coliforms and E. coli from frozen raw beef. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1.017-1.022, 1987.
- [29] RUSSELL, M.S. Comparison of the Traditional Three Most Probable Number method with the Petrifilm, Simplate, Biosys Optical and Bactometer Conductance methods for enumerating E. coli from chicken carcasses and ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 9, p. 1.179-1.183, 2000.
- [30] SCHEUSNER, D.L.; BUSTA, F.F.; SPECK, M.L. Inhibition of injured E. coli by several selective agents. **Applied Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 46-49, 1971.
- [31] SENYK, G.F.; KOZLOWSKI, S.M.; NOAR, P.S.; SHIPE, W.F.; BANDLER, D.K. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1.152-1.158, 1987.
- [32] SIQUEIRA, R.S. Manual de microbiologia de alimentos. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Rio de Janeiro, 1995.
- [33] SUWANSONTHICHAI, S.; RENGPIPAT, S. Enumeration of coliforms and E.coli in frozen black tiger shrimp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 113-121, 2000.

## 6 - AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor. E à 3M do Brasil pela gentil doação de 250 Placas Petrifilm EC para execução da maior parte deste trabalho.