



ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS: Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes

Juliana Aline Mascarenhas de Geus (UTFPR) jullymi@yahoo.com.br

Isaura Alberton de Lima (UTFPR) alberton@cefetpr.br

Resumo

Este trabalho tem como objetivo apresentar resultados comparativos entre duas diferentes técnicas, oficiais pelo Ministério da Agricultura, para detecção de coliformes fecais e totais, VRBA e Petrifilm EC. A presença destes microrganismos atua como fator indicativo de contaminação durante ou pós processo, podendo interferir na vida útil do produto. Foram realizados testes em vinte amostras de carne de aves, retiradas da linha de produção de uma indústria situada na região dos Campos Gerais, Paraná. Os resultados obtidos apresentaram uma maior sensibilidade na análise realizada por Petrifilm EC.

Palavras-chave: metodologia, coliformes, carnes.

1. Introdução

A presença de coliformes nos alimentos é de grande importância para a indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo pós-processamento. Segundo FRANCO (2005), os microrganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

A presença de *Coliformes totais* e *Escherichia coli* em alimentos processados segundo SILVA (1997), é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidencialmente práticas de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos.

A maioria dos coliformes são encontrados no meio ambiente, essas bactérias possuem limitada relevância higiênica. Devido ao fato de os coliformes serem destruídos com certa facilidade pelo calor, sua contagem pode ser útil em testes de contaminações pós-processamento. (FORSYTHE, 2002)

2. Referencial Teórico

A classificação dos coliformes segundo SILVA (1997), apresenta o grupo de *Coliformes totais* que inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Apresenta-se cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente.

Os *Coliformes fecais* são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h a 44,5-45,5°C. Esse grupo inclui três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo a cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* de origem não fecal. Por isso que *E. coli* é a mais conhecida, sendo seu habitat o trato gastrointestinal ela é a indicadora de contaminação fecal, em alimentos processados (SILVA,1997 p.31).

Para confirmação de Coliformes fecais, segundo FORSYTHE (2002), utiliza-se o caldo EC (*Escherichia coli*), por eles serem definidos como coliformes capazes de fermentar a lactose, com produção de gás, no período de 48 horas, a 45,5 °C.

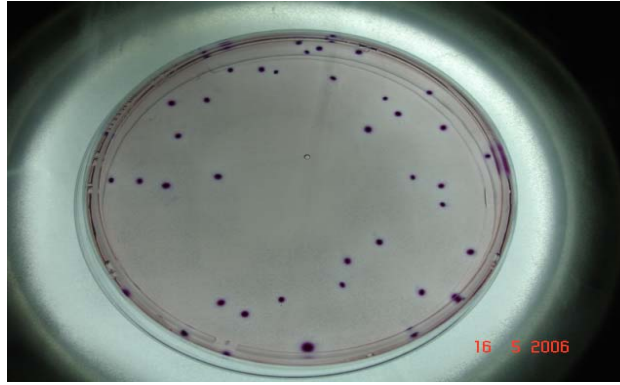
Foram aplicadas duas metodologias oficiais para detecção de *Coliformes totais Escherichia coli*. Utilizou-se o meio Ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA), seguidas de provas confirmativas e o sistema Petrifilm EC, sendo respectivamente fabricado pelas empresas Oxoid e 3M. Ambas metodologias expressam resultados por Unidade Formadoras de Colônias por ml (UFC/ml).

A metodologia utilizada segue os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura para análise de alimentos de origem animal, segundo Instrução Normativa número 62, de 26 de agosto de 2003, para análise de coliformes em VRBA e a Instrução Normativa número 40, de 12 de dezembro de 2005, para análise de coliformes em Petrifilm.

3. Detecção de coliformes totais e fecais em meio VRBA

Conforme descrito no Manual Oxoid, o meio Ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA) é um meio seletivo para a detecção e enumeração de coliformes. O meio tem sido utilizado para a determinação do conteúdo de coli-aerogenes na água, leite e outros produtos lácteos, equipamentos de laticínios, e produtos alimentícios. Os microrganismos que fermentam a lactose atacam rapidamente a lactose do meio produzindo colônias púrpuras circundadas por halos púrpura, já os microrganismos não fermentadores de lactose ou que fermentam esse açúcar tardiamente produzem colônias pálidas com zonas esverdeadas. Verificar na figura 1

Figura 1 – Coliformes totais em meio VRBA



Para a confirmação de coliformes fecais ou totais utiliza-se testes adicionais de identificação. Segundo FORSYTHE (2002), coliformes fecais são definidos como coliformes capazes de fermentar a lactose em meio EC, com produção de gás, no período de 48 horas, a 45,5 °C.

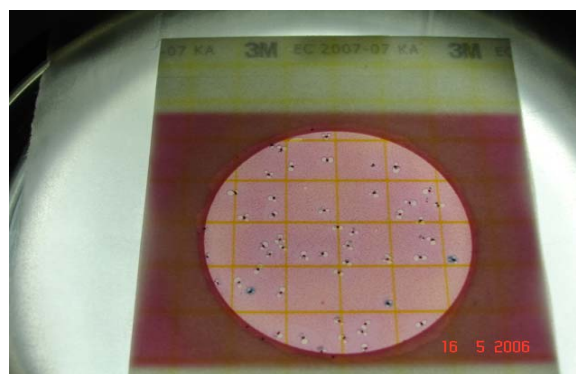
Os procedimentos convencionais são, por natureza, trabalhosos e consomem muito tempo (FORSYTHE, 2002 p. 210).

4. Detecção de coliformes totais e fecais em Petrifilm EC

Segundo FORSYTHE (2002, p. 211), os métodos rápidos têm sido desenvolvidos para encurtar o tempo entre a coleta da amostra e a obtenção do resultado. O sistema Petrifilm é uma alternativa mais rápida ao método de plaqueamento convencional. O sistema utiliza uma mistura desidratada de nutrientes (ágar vermelho violeta bile) e agente geleificante (solúvel em água fria) e um indicador de atividade glicuronidásica (5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-glicuronideo) e um indicador tetrazólico para facilitar a enumeração das colônias sobre um filme, conforme descrito na figura 2.

Além das vantagens de facilitar o trabalho do microbiologista, os sistemas comerciais produzidos por empresas idôneas são submetidos a rigorosos testes de controle de qualidade, o que garante sua confiabilidade e reprodutibilidade. Em alguns desses sistemas, o número de testes bioquímicos para um único microrganismo é grande, o que permite a obtenção de resultados mais corretos e precisos. Outras vantagens são também importantes: facilidade de estocagem, uso e descarte. A interpretação de resultados é também mais fácil e rápido (FRANCO, 2005 p.171).

Figura 2 – Coliformes totais e fecais em Petrifilm EC



Colônias de *E. Coli* são azuis ou vermelho-azulada com gás (95% das colônias formam gás) associado próximo a colônias. Colônias de coliformes são vermelhas com gás associados próximos as colônias.(3M)

5. Resultados

Ambas as técnicas realizadas são descritas pelo resultado, unidade formadora de colônias por ml, ou UFC/ml. Foi utilizado um padrão de diluição (10^{-2}). Foram utilizadas vinte amostras de carne de frango. Os resultados obtidos através das análises de *Coliformes totais* estão demonstrados a seguir na tabela 1 e percentualmente no gráfico 1.

Tabela 1 – *Coliformes totais*

	Petrifilm	VRBA
1	400	<100
2	500	600
3	200	<100
4	<100	100
5	<100	<100
6	200	<100
7	200	<100
8	<100	<100
9	<100	100
10	200	<100
11	200	<100
12	100	<100
13	100	<100
14	1200	1200
15	5000	3900
16	400	200
17	100	100
18	100	<100
19	5300	4800
20	100	<100

Fonte: Da Autora (2006)

As análises de *Coliformes totais* indicam que 20% dos resultados foram iguais entre as duas técnicas. Em 65% obteve-se contagem maior no Petrifilm EC do que no VRBA, e em 15% das amostras analisadas obteve-se contagem menor no Petrifilm EC em relação ao VRBA.

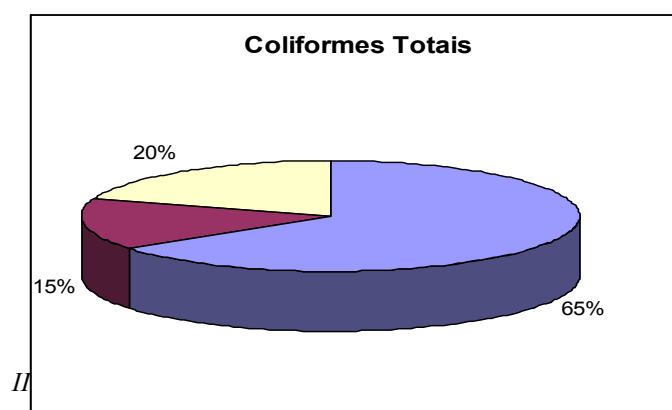


Gráfico 1 –
Percentual de
Coliformes totais

Os resultados obtidos na análise de *Coliformes fecais* em carnes de frango estão demonstrados na tabela 2, e sua percentagem está no gráfico 2.

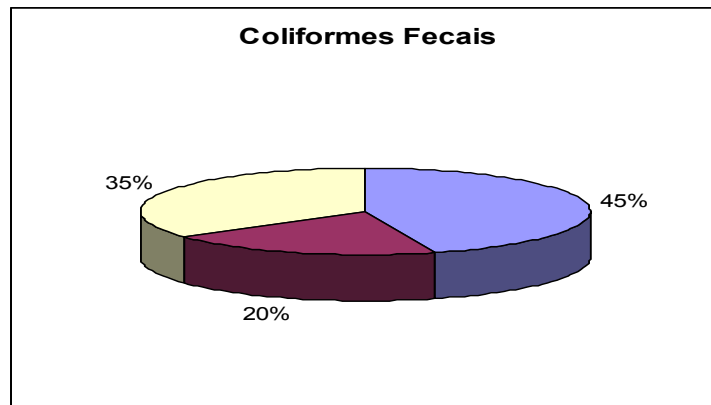
Tabela 2 - *Coliformes fecais*

Amostra	Petrifilm	VRBA
1	300	<100
2	300	400
3	100	<100
4	<100	<100
5	<100	<100
6	100	<100
7	100	<100
8	<100	<100
9	<100	100
10	100	<100
11	200	<100
12	<100	<100
13	100	<100
14	1000	1200
15	4100	3900
16	<100	<100
17	100	100
18	100	<100
19	300	4800
20	<100	<100

Fonte: Da Autora (2006)

Nas amostras de carne de frango os resultados obtidos de *Coliformes fecais* foram de 35% de analitos iguais entre as técnicas. Em Petrifilm EC obteve-se 45% de contagem maior do que no VRBA, e 20% das amostras analisadas obteve contagem menor em Petrifilm EC comparados com a outra técnica.

Gráfico 2 – Percentual de *Coliformes fecais*



Com estes resultados observamos uma sensibilidade maior na técnica realizada por Petrifilm EC, sendo esta a que conteve maior número de unidades formadoras de colônias por ml.

Conclusão

Este trabalho teve como objetivo comparar duas metodologias oficiais pelo Ministério da Agricultura, VRBA e Petrifilm EC. As amostras foram obtidas de uma indústria de carnes, situada na região dos Campos Gerais, Paraná. A presença de coliformes nos alimentos é de grande importância para a indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo pós-processamento. Nas 20 amostras de carnes de frango analisadas, a presença de coliformes totais e fecais indicaram maior sensibilidade de detecção na técnica Petrifilm EC. A diferença entre os resultados observados ocorre em parte porque a análise de coliformes em VRBA é mais demorada, pois necessita de provas confirmativas. A análise por Petrifilm EC é menos manipulada e seu resultado sai mais rápido do que o VRBA, agilizando o processo.

Referências

3M. Petrifilm: Placas para contagem de *Escherichia coli*. **Instrução de uso**. 3M do Brasil Ltda. Microbiologia. St Paul, MN 55144-1000

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. Maria carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed, 2002, p 216, 211.

FRANCO, Bernadete D. G. M; LANDGRAF, Mariza, Maria Tereza Destro. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.p27-171.

Manual OXOID, 1º Edição, 2000 Português, traduzido por Bernadete D. G. M. Franco, Maria Eloiza Landgraf, Mariza Landgraf.

SILVA, Neusely da. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Valéria Christina Amstalden - São Paulo : Livraria Varela, 1997, p31.