
MÉTODOS RÁPIDOS E AUTOMATIZADOS PARA ENUMERAÇÃO DE MICROORGANISMOS INDICADORES EM LEITE - UTILIZAÇÃO NO BRASIL

LUÍS AUGUSTO NERO
VANERLI BELOTI
MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA BARROS

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite - Utilização no Brasil- *Semina: Ci. Agrárias*. Londrina, v, 21. n. 1. p. 115-126, mar. 2000.

RESUMO: A presente revisão descreve os principais métodos rápidos e automatizados utilizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite e avalia sua adequação ou não na indústria láctea brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: Leite, microbiologia láctea, métodos rápidos.

1 INTRODUÇÃO

A análise microbiológica de alimentos vem sendo utilizada há muito tempo como uma forma de controle e monitoramento da matéria-prima e do produto industrializado. Esse controle é de extrema importância, já que permite assegurar a qualidade do alimento, para que este não ofereça riscos à saúde do consumidor, e tenha as suas características físico-químicas e organolépticas garantidas no consumo.

O controle microbiológico na indústria láctea assume importância ainda maior devido à ocorrência de um número cada vez mais significativo de surtos de toxinfecção alimentar que, com frequência, estão associados ao consumo de leite e derivados (Camargo, 1996). O leite, por ser um produto de origem animal, pode veicular vários agentes potencialmente zoonóticos. além de ser um alimento muito rico em sua composição nutricional, o que favorece o crescimento microbiano.

O monitoramento microbiológico em amostras de leite e outros alimentos, é realizado através da pesquisa de microrganismos chamados indicadores, que, quando presentes no alimento, podem fornecer informações sobre as condições sanitárias durante o processamento, produção ou armazenamento, possível presença de patógenos,

deterioração do alimento ou contaminação fecal (Franco & Landgraf, 1996). Na microbiologia láctea, são de grande importância como indicadores, os microrganismos aeróbios mesófilos (MAM) e o grupo dos coliformes.

Microrganismos aeróbios mesófilos são todos aqueles capazes de crescer em temperatura de 35-37°C em condições de aerobiose. Esses microrganismos indicam a qualidade sanitária com que o alimento foi obtido ou processado. Um número elevado destes microrganismos indica que o alimento é insalubre, mesmo que patógenos estejam ausentes. No entanto, deve-se considerar que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas. e portanto, uma alta contagem de mesófilos pode significar que houve condições para o crescimento de patógenos (Franco & Landgraf, 1936).

O grupo dos coliformes totais é o principal indicador utilizado para avaliar a qualidade microbiológica da água e alimentos (Covert et al., 1989; Matner et al., 1990). sendo a presença de membros desse grupo, indicativa de tratamento inadequado ou contaminação pós-desinfecção. Fazem parte deste grupo, predominantemente, bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, que têm a capacidade de fermentar a lactose produzindo ácido e gás quando incubadas a 35-37° C (Franco & Landgraf, 1996).

¹ Médico Veterinário, Programa de Mestrado em Sanidade Animal, DMVR CCA. UEL, Londrina. PR. Docente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UEL, Londrina, PR.

² Médica Veterinária, responsável pelo Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, CMVP, CCA. UEL, Londrina. PR.

As bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes fecais, correspondem aos coliformes totais que continuam fermentando a lactose com produção de gás quando incubados a 44-45,5^o C. Nessas condições, cerca de 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto poucas copas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm esta característica. A *E. coli* é o único microrganismo deste grupo que tem como habitat natural o trato intestinal de homens ou animais de sangue quente, sendo um seguro indicador de contaminação fecal. Os demais microrganismos do grupo coliformes, podem estar presentes também em outros ambientes, como vegetais e solo (Franco & Landgraf, 1996).

Ma indústria láctea, a contagem de coliformes é utilizada como indicativo de higiene na produção do leite ou da contaminação pós-pasteurização (Senik *et al.*, 1987)

As análises microbiológicas tradicionais para o controle de qualidade em alimentos foram desenvolvidas a partir do final do século XIX e vêm sendo utilizadas desde então (Senyk *et al.*, 1987). A base da microbiologia láctea continua sendo o plaqueamento convencional e a caracterização bioquímica dos microrganismos de interesse (Vasavada *et al.*, 1993), assim como a enumeração de coliformes totais e fecais pelo método de fermentação em tubos múltiplos (Gale & Broberg, 1993).

Os métodos tradicionais apresentam desvantagens na enumeração de microrganismos indicadores, podendo-se citar o trabalho excessivo em laboratório, o uso de grande quantidade de vidrarias e meios de cultura, a necessidade da realização de análises em duplicata e de grande espaço para incubação das placas. Deve-se considerar ainda a possibilidade de falhas na técnica, como a alta temperatura do ágar fundido utilizado no método tradicional de semeadura por profundidade e maiores riscos de contaminações devido ao grande número de etapas no preparo e semeadura da amostra (Chain & Fung, 1991),

Apesar disso, a contagem de colônias de MAM em leite cru e pasteurizado, bem como a técnica de tubos múltiplos para enumeração de coliformes, são aceitas como bons indicativos de qualidade microbiológica (O'Connor, 1984). No entanto, além de trabalhosas, as técnicas são lentas e os resultados só são conhecidos 2 a 7 dias após o início das análises, e para alguns produtos, como o leite, o tempo para a obtenção de resultados não é compatível com a sua perecibilidade (Vasavada *et al.*, 1993).

As limitações da metodologia tradicional têm

levado ao desenvolvimento de métodos alternativos na microbiologia de alimentos. Várias técnicas para enumerar e identificar bactérias têm sido estudadas, e são atualmente denominadas de métodos rápidos. Esses métodos são mais práticos e simples na execução, requerem pequena quantidade de material e fornecem resultados mais rapidamente. Geralmente a praticidade já justifica a utilização desses sistemas, com economia de tempo e material no laboratório, permitindo aumentar o número de amostras analisadas e processadas por dia, mesmo que em alguns deles o tempo de incubação seja similar ao dos métodos convencionais (Vasavada *et al.*, 1993). Um teste rápido ideal possuiria as seguintes características: rapidez, economia e confiabilidade (Bigalke, 1984).

Durante mais de duas décadas os métodos rápidos têm sido desenvolvidos com o objetivo de substituir a metodologia tradicional na análise microbiológica de alimentos (Vasavada *et al.*, 1993). Particularmente na microbiologia de leite e derivados a dificuldade de avaliação da qualidade do leite a tempo de se tomar medidas corretivas efetivas, tem apressado a implantação dos métodos rápidos como o plaqueamento em espiral, filtração em membrana com grade hidrofóbica (HGMF), microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, técnicas de impedância e condutância e vários "kits" para a caracterização bioquímica e contagem de microrganismos (Bishop & Juan, 1988). Outros métodos, como os bioluminescentes, imunoenzimáticos e com ácidos nucleicos para detecção de patógenos específicos e toxinas, também têm aumentado sua aceitação para uso na microbiologia de alimentos (Vasavada *et al.*, 1993).

A maioria dos métodos rápidos, desenvolvidos para detecção de coliformes, emprega a tecnologia do substrato definido, envolvendo a inclusão no meio de cultura de substratos específicos para enzimas constitutivas dos coliformes. Estes substratos são ligados a compostos indicadores de sua utilização. Assim, quando o microrganismo está presente, produz a enzima capaz de clivar o substrato e liberar o indicador que quando livre, altera a sua coloração ou produz fluorescência. Além disso, para melhorar a especificidade na indicação da contaminação fecal, os métodos rápidos detectam especificamente a *E. coli* e não coliformes fecais.

Vasavada *et al.* (1993) previam que assim que os métodos rápidos fossem bem reconhecidos, seriam muito bem utilizados na microbiologia láctea, em substituição aos métodos tradicionais

de contagem em placas, estimativa de Número Mais Provável e testes empíricos como a redução do azul de metileno e da resazurina. No entanto, na escolha de um método rápido, alguns cuidados devem ser considerados, como a importância de conhecer-se o princípio ativo de cada método, a micróbioLa do alimento analisado e os fatores que influenciam sua composição, uma vez que, estes métodos foram desenvolvidos tomando-se por base uma microbiota típica de países nos quais, as condições de produção, conservação e mesmo climáticas, diferem, em muito, das encontradas no Brasil.

1.1 Microbiota do leite

A microbiota do leite cru é bastante variável e depende de diversos fatores relacionados aos animais, manipuladores e meio ambiente, incluindo os equipamentos utilizados na ordenha. Em leites com contagens de MAM abaixo de 5.000 UFC/mL, a mínima contaminação do produto pelo exterior do úbere, e pelos equipamentos resulta no predomínio de microrganismos não termodúricos da Família Micrococaceae (incluindo estafilococos), e estreptococos, que são bactérias do interior do úbere e da microbiota normal da pele do teto.

Os grupos predominantes comumente são: micrococcos não termodúricos e estafilococos (30 a 99%), estreptococos (0 a 50%), corineformes (<10%), bacilos esporulados (<10%) e outros (<10%) incluindo aqui os bolores e leveduras. Quando as contagens de microrganismos aumentam, há um incremento na porcentagem de termodúricos, cocobacilos Gram negativos, inclusive coliformes, em detrimento dos outros micrococáceos (Brannley & McKinnon, 1990)

Grande variação no número de termodúricos e psicotróficos no leite cru tem sido relatada e atribuída à diferenças regionais, sazonais, ou associada a métodos de limpeza e desinfecção dos equipamentos nas diferentes propriedades (Thornan; & Thomas, 1990).

Algumas espécies do gênero *Micrococcus* e o *Microbacterium* sp (cocobacilo Gram positivo do grupo corineforme) são termodúricos, oriundos quase que exclusivamente dos equipamentos de ordenha. Sua multiplicação no leite é muito pobre, portanto, quando a contagem destes microrganismos é alta significa que a carga contaminante foi grande, indicando deficiências na higienização e sanitização de equipamentos (Brannley & McKinnon, 1990).

O tipo de acondicionamento do leite também pode interferir na contagem de termodúricos.

Essas contagens são maiores em leite acondicionado em latões do que quando mantidos sob refrigeração em tanques. A higienização de latões é mais dificultada e sua refrigeração é menos eficiente. Os corineformes encontrados no leite, também podem ter como origem a água, assim como os microrganismos Gram negativos como *Pseudomonas* sp, coliformes e outros cocobacilos.

As bactérias Gram negativas, de modo geral, não são termodúricas, portanto sua presença no leite pasteurizado pode significar recontaminação, pasteurização inadequada ou alta carga microbiana na matéria-prima (Brannley & McKinnon, 1990). Muitas das bactérias Gram negativas, apesar de não sobreviverem à pasteurização, produzem enzimas proteolíticas termoestáveis, que além de interferir no processo de coagulação do leite, produzem metabólitos que conferem sabor e odor desagradáveis ao produto.

1.2 O leite produzido no Brasil

O Ministério da Agricultura e Reforma Agrária do Brasil (Brasil, MARA, 1997) determina para o leite pasteurizado os limites de 500 UFC/mL de MAM para o leite tipo A, 40.000 UFC/mL de MAM para o leite tipo B e 150.000 UFC/mL de MAM para o leite tipos C, Integral, Light e Desnatado. No entanto, é conhecido que as contagens obtidas em análises de rotina são muito superiores aos limites estabelecidos.

Em várias pesquisas sobre a qualidade microbiológica do leite pasteurizado, produzido em diversas regiões do Brasil, os autores encontraram entre 6% e 70% de amostras fora do padrão (Nader et al., 1938; Beloti et al., 1997). Outro agravante é que as normas do MARA para o controle de qualidade do leite cru, determinam que se realize a contagem de MAM apenas para os leites tipos A e B, Para o leite tipo C, que corresponde a 92% da produção nacional, não se exige esse controle na matéria-prima. A contagem de coliformes também não precisa ser realizada (Brasil, MARA, 1997).

Baseado nessas informações, é possível concluir que provavelmente apenas uma pequena porcentagem da indústria láctea brasileira controla coliformes ou mesmo o total de bactérias em leite cru (Brasil, MARA, 1997).

Como resultado, o leite brasileiro apresenta uma considerável carga microbiana, e pode se esperar que sua microbiota seja típica de leite com contagens elevadas, apresentando alta porcentagem de termodúricos e cocobacilos Gram negativos. Os microrganismos termodúricos

formarão uma indesejável microbiota remanescente no leite pasteurizado, que terá diminuído o seu tempo de vida de prateleira. De fato, Belott (2000) estudando a microbiota do leite pasteurizado, encontrou 52% de cocobacilos Gram positivos, 23% de cocos Gram positivos e 17,1% de cocobacilos Gram negativos, entre outros, e concluiu que a composição dessa microbiota indica carência de boas práticas na produção do leite, bem como recontaminação pós-pasteurização. Como agravante, além de inadequada para leite pasteurizado, essa microbiota formada predominantemente por cocos e cocobacilos Gram positivos, prejudica o desempenho de métodos rápidos para contagem de MAM.

2 MÉTODOS RÁPIDOS PARA ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM AUMENTOS

2.1 Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, EUA),

O sistema Petrifilm™ é composto por um sistema de filme duplo: um filme que serve de base, recoberto com nutrientes desidratados e agentes geleificantes solúveis à frio, e um filme superior, de polietileno, que contém um indicador de cor e agentes geleificantes (Vasavada, 1993). A amostra, diluída ou não, é inoculada na superfície do filme base e o filme superior é sobreposto. Com o auxílio de um difusor plástico, a amostra é espalhada em uma área determinada. Após solidificação da substância geleificante, o conjunto é incubado na temperatura e tempo indicados pelo fabricante. Após a incubação, as colônias visíveis são enumeradas e o resultado é expresso em UFC/mL.

O sistema Petrifilm™, particularmente, tem recebido grande aceitação como alternativo ao método padrão de semeadura por profundidade de contagem em placas na análise microbiológica de alimentos (Beauchat et al., 1998). As placas Petrifilm™ para a contagem de MAM e de coliformes em leite e derivados são reconhecidas pela Association of Official Analytical Chemists e Standard Methods for Examination of Dairy Products (Curiale & Fahey, 1989).

Várias versões do Petrifilm™ estão disponíveis no mercado: para contagem de aeróbios mesófilos (AC), coliformes (CC, HSCC), coliformes e *Escherichia coli* (EC), enterobactérias (EB), *Sataphylococcus aureus* (RSA) e bolores e leveduras (YM).

O Petrifilm™ AC possui os mesmos nutrientes encontrados no ágar padrão de contagem (PCA) e

o indicador cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), que quando reduzido pelas colônias em crescimento, confere a elas a coloração vermelha. A leitura da placa de Petrifilm™ AC inoculada pode ser realizada após incubação a 35° C por 48h.

Ginn et al. (1984) relataram que o Petrifilm™ AC revela, de forma geral, contagens menores de MAM em leite cru quando comparado à metodologia padrão de contagem em placas. A explicação fornecida pelos autores para essa anormalidade é a possibilidade do TTC funcionar como inibidor de crescimento de algumas espécies de microrganismos. Apesar dessa constatação, os autores consideraram o sistema Petrifilm™ AC apropriado como um método alternativo para contagem de microrganismos viáveis em leite cru na rotina laboratorial.

Em estudo colaborativo realizado por Ginn et al. (1986), foi pesquisada a utilização do Petrifilm™ AC para enumeração de MAM em leites cru e pasteurizado homogeneizado. Os resultados permitiram aos autores concluir que o Petrifilm™ AC pode ser utilizado como uma alternativa à metodologia padrão.

McAllisler et al. (1987) realizaram um estudo comparando o Petrifilm™ AC com o método padrão para enumeração de MAM em derivados de leite. Os autores não encontraram diferenças significantes entre produtos desnatados e não desnatados para as contagens em ambos os métodos, o que indica que a gordura do leite não influencia o desempenho do Petrifilm™ AC. Considerando todas as amostras analisadas, os autores encontraram uma correlação de 0,98 com o método padrão, indicando a viabilidade da utilização do Petrifilm™ AC para derivados de leite.

Em outro estudo colaborativo realizado por 11 laboratórios, (Curiale & Fahey, 1989) o Petrifilm™ AC foi avaliado para a enumeração de MAM em derivados de leite (achocolatado, queijo pasteurizado, leite em pó desnatado, leite evaporado e sorvete de creme). De acordo com os resultados, os autores concluíram que o Petrifilm™ teve um desempenho tão bom quanto à metodologia padrão.

Uma avaliação do Petrifilm™ AC para contagem de MAM em leite cru foi realizada por 14 laboratórios, comparando-o com a metodologia padrão (Piton & Grappin, 1991). Os resultados indicaram boas repetibilidade e reprodutibilidade do sistema Petrifilm™ AC.

Chain & Fung (1991) avaliaram a eficiência do Petrifilm™ AC para contagem de MAM em leite cru, comparando-o com a metodologia tradicional

em placas e com outros sistemas (Redigel™, Spiral Plate™, Isogrid™) e encontraram uma correlação de 0,99 em todas as comparações. Além da alta correlação encontrada, os autores descreveram como vantagens para o uso do Petrifilm™ AC a praticidade de semeadura, a facilidade na visualização e contagem de colônias e o pouco espaço requisitado para estocagem e incubação, que corresponde a cerca de 10% do espaço requisitado pela metodologia tradicional. A única desvantagem citada foi a necessidade de muito cuidado na semeadura, no momento de espalhar a amostra com o difusor plástico do sistema, momento em que, segundo os autores, pode ocorrer uma perda parcial da amostra.

Senik et al. (1987) indicaram uma falta de equivalência entre os resultados obtidos no Petrifilm™ AC e no método padrão de contagem de MAM em leite pasteurizado, provavelmente devido à constituição da microbiota láctea das amostras analisadas, resultando em contagens de MAM mais baixas no Petrifilm™ AC.

Ainda em leite pasteurizado, Beloti et al. (1999b) verificaram que o desempenho do Petrifilm™ AC é prejudicado pela presença marcante de microrganismos termotóxicos na microbiota do leite brasileiro. Esses microrganismos apresentam baixa capacidade redutora do TTC ou não o reduzem, e dessa forma, não produzem colônias vermelhas, não sendo identificados pelo método.

Para a contagem de coliformes, as placas Petrifilm™ CC e HSCC possuem os nutrientes encontrados no ágar vermelho violeta bile (VRB), TTC e agentes seletivos. Os coliformes crescem e reduzem o TTC, assumindo a coloração vermelha, além de fermentar a lactose e produzirem gás, que aparece associado às colônias. Para identificação de *E. coli*, a placa de Petrifilm™ EC, além dos componentes já citados presentes no CC e HSCC, contém o 5-bromo-4-eloro-3-indolil-b-D-glucuronideo (BCID), que indica a atividade glucuronidásica da *E. coli*. Cerca de 97% das cepas de *E. coli* produzem a enzima glucuronidase, que cliva o BCIO e libera o indicador que torna a colônia azul, sempre associada a bolhas de gás produzidas pela fermentação da lactose. Normalmente, as placas para contagem de coliformes são incubadas por 24h a 35° C, porém podem ser necessárias 24h adicionais para identificação das colônias de *E. coli*.

Estudos realizados por Matner et al. (1990) demonstraram uma maior sensibilidade e simplicidade do Petrifilm™ EC, além de ser mais

rápido e de baixo custo, quando comparado com o método padrão de contagem em placas que utiliza o VRB,

Nelson et al. (1934) compararam o Petrifilm™ EC com a técnica de tubos múltiplos, utilizando os caldos Lauril Sulfato e o Lactosado Bile Verde Brilhante, e o plaqueamento convencional em VRB para enumeração de coliformes em leite cru. Os autores relataram uma correlação de 0,93 entre o Petrifilm™ EC e o VRB e 0,90 entre o Petrifilm™ EC e o método de Número Mais Provável (NMP) na técnica dos tubos múltiplos com ambos os caldos utilizados.

Curiale et al. (1991) avaliaram o Petrifilm™ EC comparando-o com o método de NMP em tubos com o objetivo de enumerar coliformes em leite. Nessa pesquisa foram utilizadas cepas puras de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*, que foram inoculadas em leite esterilizado laboratorialmente. Os autores relataram uma correlação de 0,913 entre o Petrifilm™ EC e o método padrão além de constatarem alta repetibilidade e reprodutibilidade.

Beloti (2000) avaliou a eficiência do Petrifilm™ EC em leite pasteurizado comparando-o com o método padrão de contagem de coliformes em placas, que utiliza o ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), obtendo uma correlação de 0,802. Os resultados indicaram uma coincidência de resultados em 42,5% das amostras analisadas. Entretanto, 41,4% dos resultados foram maiores no Petrifilm™ EC, indicando que a baixa correlação se deve a uma maior sensibilidade deste sistema.

2.2 SimPlate™ (BioControl Systems, Inc., Bellevue, WA, EUA)

O sistema SimPlate™ foi desenvolvido pela IDEXX Lab. Inc., Westbrook, MA, EUA. com o objetivo de oferecer um diagnóstico rápido e prático na detecção de diversos microrganismos presentes em alimentos, fornecendo resultados em Número Mais Provável (NMP) baseado na positividade de 84 cavidades de uma placa especialmente desenvolvida. A amostra a ser analisada é adicionada ao meio de cultura e a mistura é transferida para a placa de SimPlate™. Após a retirada do excesso de líquido, a placa é invertida e incubada a 35° C por 24h. O total de microrganismos viáveis é determinado pelo número de cavidades com resultado positivo que corresponde a um valor de NMP de UFC, conforme uma tabela de equivalência fornecida pelo fabricante.

A primeira formulação do meio de cultura

utilizado para determinar contagem total de MAM no sistema SirnPlate™ se baseava na Tecnologia de Múltiplas Enzimas (Townsend & Naqui, 1998). O meio de cultura utilizado era composto por vários substratos para múltiplas enzimas, que quando produzidas pelos microrganismos metabolizavam os referidos substratos que liberavam 4-metil-umbeliferona, substância que fluoresce quando exposta à luz ultravioleta (365nm) (Beauchat et al., 1998). Consideravam-se como cavidades positivas, aquelas que apresentassem fluorescência à luz ultravioleta após 24h do incubação a 35 ° C.

O SimPlate™ Total Plate Color (TPC) foi avaliado para enumeração de MAM em alimentos (Beauchat et al., 1998), e comparado com o método padrão de contagem em placas, Petrifilm e Redigel. Os autores encontraram alta correlação em todas as comparações (0,97). Também foi descrita como vantagem a ausência da necessidade de preparo e esterilização do meio de cultura. A desvantagem encontrada foi a impossibilidade de se obter colônias isoladas e a imprecisão da determinação do número de microrganismos presentes no alimento, já que é uma técnica que se baseia em Número Mais Provável.

Beloti (2000) avaliando o desempenho do SirnPlate™ TPC para enumeração de MAM em leite pasteurizado encontrou variação no número de cavidades fluorescentes quando a leitura se realizava nos extremos da distância preconizada pelo fabricante (12 a 15 cm), provocando uma grande margem de dúvida na leitura das placas. Além disso, Foi encontrada uma baixa correlação (0,71) entre o sistema e a metodologia tradicional de contagem de aeróbios mesófilos em placas (PCA), devido a alta frequência no leite de microrganismos que não metabolizavam os substratos disponíveis no meio de cultura e, dessa forma, não emitiam fluorescência, resultando em cavidades falso-negativas.

O SirnPlate™ TPC Color Indicator (CI) recentemente lançado no mercado para enumeração de MAM utiliza um princípio diferente, no qual o meio de cultura TPC contém a substância indicadora resazurina, de coloração azul escura quando está na forma não reduzida. O crescimento bacteriano provoca uma alteração do potencial de oxi-redução, causando redução do meio e resultando na mudança da cor do indicador, A resazurina reduzida assume a coloração rosa, devido à formação de resorufina, que por sua vez pode formar dihidroresorufina que varia entre o incolor e o amarelado; essas são as cores observadas nas cavidades com resultado positivo

do SirnPlate™ TPC CI. Portanto, qualquer alteração da cor original (azul) é considerada resultado positivo.

Uma avaliação do SirnPlate™ TPC CI para contagem de MAM em alimentos foi realizada (Smith & Townsend, 1999) comparando-o com o método padrão de contagem em placas, Petrifilm™ e Redigel. Os resultados revelaram uma correlação de 0,94 do SirnPlate™ TPC CI com o método padrão, 0,92 com o Petrifilm™ e 0,97 com o Redigel™. Em todas as ocasiões, foi considerada como oficial a leitura em 24h do Sim Plate™ TPC CI.

Nero (2000) avaliou o desempenho do SimPlate™ TPC CI para enumeração de MAM em 142 amostras de leite pasteurizado, comparando-o com o método padrão de contagem em placas, utilizando Ágar Padrão para Contagem em placas (PCA). Os resultados revelaram uma correlação entre os métodos de 0,68 e variância de 0,76, quando a leitura foi realizada em 24h, conforme orientação do fabricante. No entanto, para leitura em 48h a correlação foi de 0,91 e a variância de 0,084. A mesma pesquisa revelou que a correlação observada melhora à medida que melhora a qualidade do leite analisado, independente do tempo de incubação do SimPlate™ TPC CI.

Sendo um meio de cultura que não depende da utilização de substratos enzimáticos específicos para indicar a presença de bactérias, o TPC CI pode ser utilizado sem sofrer nenhuma interferência de possíveis enzimas naturalmente presentes nos alimentos (Smith & Townsend, 1999).

A resazurina é um indicador utilizado na prova da redutase do leite que é um método indireto, porém bastante rápido, para determinação da qualidade bacteriológica do leite em função do metabolismo redutor de diversos microrganismos. Nesse teste, o tempo de redução do corante é inversamente proporcional à quantidade de bactérias presentes no leite, sendo portanto apenas uma prova estimativa, não determinando a quantidade exata de microrganismos presentes no leite.

O teste de redução pela resazurina tem sido utilizado por muitos anos pela indústria láctea como um indicador da qualidade higiênica do leite cru. Entretanto, não produz resultados que possam ser confiavelmente correlacionados com a contagem bacteriana em leite, sendo explícita a recomendação de que os resultados não devem ser divulgados em termos de número bacteriano em nenhuma circunstância (Holley *et al.*, 1977).

O SimPlate™ TPC CI, entretanto, não se baseia no tempo de redução da resazurina, como ocorre na prova da redutase, e sim na quantidade

de cavidades que apresentam redução do indicador devido ao crescimento bacteriano em 24h, que corresponde a um valor em NMP de UFC/mL.

Ainda existem Fatores que devem ser considerados, como o fato de *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus subtilis*, microrganismos psicófilos e termofílicos serem dotados de menor atividade redutora. Os microrganismos produtores de ácido láctico reduzem com maior rapidez que os não produtores. Bactérias psicrotróficas Gram negativas como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp, *Alcaligenes* sp, *Flavobacterium* sp reduzem lentamente a resazurina.

A velocidade de redução depende da habilidade dos microrganismos em transferir elétrons presentes no meio para o oxigênio, e para a resazurina (Venkitanarayanan *et al.*, 1997). A molécula de resazurina possui uma considerável quantidade de oxigênio livre, o que indica ser um bom receptor de elétrons,

Leucócitos presentes no leite cru possuem grande capacidade redutora; a exposição maior à luz, assim como a presença de oxigênio no leite, também podem interferir nos resultados da redutase. Quanto maior a população bacteriana e celular, composta por leucócitos, mais rapidamente a resazurina é reduzida (Baker *et al.*, 1942). Sua sensibilidade à presença de leucócitos indica com facilidade a presença de colostro ou leite mastítico.

O tempo requerido para a redução da resazurina é bem menor quando comparado ao tempo de redução do azul de metileno, devido à sua alta sensibilidade às variações do potencial de oxidação-redução do leite, promovido pelas bactérias, leucócitos e luz. O azul de metileno necessita de um potencial de redução elevado para mostrar alteração de cor.

• O sistema SimPlate™ ainda pode ser utilizado para detectar e quantificar coliformes totais e *E. coli* (CEc) em alimentos, com leitura em 24h, sem a necessidade de passos confirmatórios (Townsend *et al.*, 1998). A placa utilizada é o princípio de contagem são os mesmos empregados para contagem total, diferenciando-se apenas o meio de cultura utilizado, que emprega a tecnologia do substrato definido. Um dos nutrientes presentes no meio de cultura é o vermelho clorofenol B-D-galactopiranosídeo (CPRG), que quando clivado pela p-D-galactosidase, presente em todos os coliformes, torna-se vermelho. A identificação de *E. coli* é feita pela enzima β -D-glucuronidase, que quebra o 4-metil-umbeliferil p-D-glucuronídeo (MUG), liberando a umbeliferona, que fluoresce à luz ultravioleta.

Townsend *et al.*, (1993) avaliaram o SimPlate™ CEC para enumeração de coliformes e *E. coli* em alimentos, comparando-o com o Petrifilm™ EC, técnica de NMP no sistema de tubos múltiplos e plaqueamento em VRB+MUG. O SimPlate™ CEC apresentou correlação boa quando comparado com os outros métodos ($r = 0,90$) para a detecção e a quantificação de coliformes. Resultados semelhantes foram encontrados para enumeração de *E. coli* ($r > 0,86$), indicando a equivalência do SimPlate™ CEC aos outros métodos avaliados para enumeração de coliformes e *E. coli*.

Beloti (2000) avaliou o SimPlate™ CEC para enumeração de coliformes e *coli* em 145 amostras de leite pasteurizado comparando-o com a técnica de fermentação em tubos múltiplos utilizando o CLBVB. Os resultados indicaram ausência de correlação entre os métodos.

Em fevereiro de 2000, a BioControl Systems, Inc. anunciou a obtenção da patente de três produtos da IDEXX Laboratories, Inc., entre eles o sistema SimPlate™ (Biocontrol, 2000).

2.3 ColiSure™ (IDEXX Laboratórios Inc., Westbrook, W1A, EUA)

O sistema ColiSure™ foi desenvolvido para a detecção qualitativa de coliformes totais e *E. coli* em água. O meio desidratado é reconstituído em 100 ml de amostra de água e incubado à 35° C por 24h. A presença de coliformes é observada pela coloração vermelha e a *E. coli* é identificada pela fluorescência à luz ultravioleta.

O ColiSure™ emprega em seu meio de cultura os mesmos nutrientes indicadores presentes no SimPlate™ CEC, tornando-se vermelho na presença de coliformes e fluorescendo à luz ultravioleta na presença de *E. coli*. Além dos nutrientes indicadores, o ColiSure™ ainda possui detergentes e antibióticos que inibem o crescimento de microrganismos não coliformes.

Um estudo realizado por Beloti & Franco (1997) com leite pasteurizado, comparou o desempenho do ColiSure™ utilizando-o na técnica dos tubos múltiplos com a metodologia padrão de enumeração de coliformes e *E. coli* que comumente utiliza o CLBVB. Os autores encontraram uma boa correlação (0,80) entre os meios de cultura comparados. Contra-provas demonstraram uma maior sensibilidade do ColiSure™ quando comparado com o CLBVB, indicando que o ColiSure™ é uma alternativa viável para quantificação de coliformes totais e *E. coli* em leite pasteurizado, com a vantagem de oferecer resultados em 24h.

2.4 Readycult-LMX™ (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Assim como o ColiSure™, o Readycult-LMX™ é baseado na identificação de coliformes e *E. coli*, pela detecção de enzimas específicas produzidas por estes microrganismos, tendo sido também, desenvolvido para análise microbiológica de água. O meio de cultura desidratado é adicionado a 100 ml da amostra e incubado a 35°C por 24h.

Os substratos presentes no meio de cultura são o 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-p-D-Galactopiranosídeo (BCIG) e o MUG. A mesma enzima, a p'-Galactosidase promove a quebra do BCIG, modificando a coloração do meio de amarelo para azul-esverdeado, indicando a presença de coliformes. A identificação da *E. coli* é realizada pela quebra do MUG pela enzima b-glucuronidase, observada pela emissão de fluorescência sob luz ultravioleta. A confirmação da presença de *E. coli* pode ser feita ainda pela adição do reativo de Kovacs nos tubos que fluorescerem.

Barros et al. (1999) realizaram uma pesquisa visando avaliar o desempenho do Readycult-LIVIX™ para a detecção e a quantificação de coliformes totais e *E. coli* em Leite pasteurizado utilizando a técnica de tubos múltiplos e comparando-o com a metodologia tradicional em CLBVB e Triptona e EC. Os resultados das 125 amostras analisadas indicaram uma maior sensibilidade do Readycult-LIVIX™ na identificação de coliformes totais e *E. coli* e redução no tempo de leitura para 24h. Para enumeração de coliformes totais, o Readycult-LMX™ apresentou uma correlação de 0,82 com o CLBVB; em relação à enumeração de *E. coli*, o Readycult-LMX™ se correlacionou com os caldos EC e triptona em 0,86.

2.5 Plaqueamento em espiral

O plaqueamento em espiral é realizado por um equipamento que permite a automatização na semeadura de amostras de alimentos. Foi desenvolvido na década de 70 e desde então tem sido aceito na microbiologia de alimentos, como um método oficial (Vanderzant & Splittstoesser, 1992; Association of Official Analytical Chemists, 1990). Existem vários relatos sobre a utilização do método para enumeração de bactérias, fungos e leveduras em alimentos (Manninen et al., 1991).

Nesse sistema, a amostra do alimento, previamente homogeneizada, é depositada automaticamente, de forma uniforme e contínua, em quantidades decrescentes sobre uma placa com meio de cultura solidificado, obedecendo ao formato de uma espiral de Arquimedes, do centro para a

borda da placa (Chain & Fung, 1991). Após a semeadura, a placa é incubada e as colônias crescem ao longo da trilha espiral formada pelo processo. De acordo com a quantidade de amostra dispensada, a placa é dividida em setores correlacionados com diluições, que poderão ser escolhidos para contagem, já que uma mesma placa apresenta -1 diluições decimais em duplicata.

Após escolha do(s) setor(es) conveniente(s), é feita a contagem de colônias e o resultado obtido é corrigido, a fim de se determinar a contagem final (Fung, 1996). O mecanismo desenvolvido, para o plaqueamento em espiral, reduz o tempo, o número de diluições, equipamentos e espaço físico requerido para as análises microbiológicas (Peeler et al., 1977).

Numa comparação com o método padrão de contagem de MAM (Chain & Fung, 1991), o sistema revelou uma correlação de 0,93, além das vantagens de possuir uma contagem de colônias facilitada e a necessidade de apenas uma placa por amostra, já que dilui automaticamente a amostra no momento da semeadura, e cada diluição é semeada em quadriplicata. Os autores descreveram como desvantagens a necessidade do preparo ideal da placa com o ágar solidificado, já que este tem que possuir uma superfície uniforme e não conter nenhuma bolha de ar, que influenciaria no caso do plaqueamento em espiral estar associado a um método de contagem automática.

Chain & Fung (1991) também relataram o baixo custo por amostra (US\$ 2,27), justificado principalmente pela utilização de apenas uma placa por amostra. Entretanto, seria necessário um investimento inicial para aquisição dos equipamentos, na fase de implantação do sistema.

Em um estudo da eficiência do plaqueamento em espiral para enumeração de colônias puras de microrganismos comparando-o com o plaqueamento em profundidade, não foram encontradas diferenças significativas a um nível de 5%, quando as placas foram contadas manualmente (Manninen et al., 1991).

Gilschrist et al. (1973) relataram a ocorrência de contagens mais altas pelo método, devido a possibilidade de grupos de bactérias se desagregarem no momento que são dispensadas sobre a placa. Manninen et al. (1991) confirmaram essa observação, considerando-a positiva por representar uma contagem mais próxima da realidade e indicaram o sistema como uma alternativa ao método de contagem em placas (PCA) para enumeração de bactérias, fungos e leveduras em leite cru, devido à maior rapidez e praticidade do método, principalmente se associado à contagem de colônias por um scanner laser.

Peeler et al. (1977) descreveram o sistema como um teste rápido para a realização de análises microbiológicas que pode ser muito útil na análise de leite.

No Brasil existem hoje poucos aparelhos, provavelmente devido ao alto custo do equipamento e a dificuldades com relação à assistência técnica.

2.6 Direct Epifluorescent Filter Technique (D.E.F.T.J)

A DEFT consiste na detecção direta da quantidade de microrganismos presentes em alimentos, através da utilização de corantes vitais, que diferenciam as bactérias viáveis das não-viáveis. O sistema necessita de apenas 20 minutos para determinar a contagem de microrganismos em leite cru e, como maior vantagem, dispensa o longo tempo de incubação que os métodos tradicionais de semeadura requerem (Tortorello & Stewart, 1994). A técnica utiliza uma membrana filtrante e um microscópio de epifluorescência, sendo extremamente sensível (Pettipher et al., 1980).

O leite é um dos alimentos em que a DEFT é aplicada com maior frequência. O processo tem início com um pré-tratamento da amostra em uma solução de detergente e tripsina: isso é necessário para garantir filtrabilidade da amostra, o que é normalmente dificultada pela presença de células somáticas e agregados microbianos no caso de leite, além da presença de glóbulos de gordura. Vários outros pré-tratamentos são descritos, porém todos baseados em diferentes concentrações de detergentes e enzimas nas soluções (Fernandez-Astorga et al., 1995).

Após o pré-tratamento, a amostra passa por uma membrana filtrante que retém os microrganismos presentes. Em seguida, a membrana contendo os microrganismos da amostra é tratada com corantes, como o alaranjado de acridina e analisada em um microscópio de epifluorescência, onde se visualiza os microrganismos viáveis em cor laranja e os não-viáveis em verde (Pettipher et al., 1980).

A DEFT se correlaciona muito bem com o método padrão de contagem de microrganismos em placas (0,94), servindo como base para uma rápida resposta da qualidade do leite para produtores e para a indústria, já que a análise é extremamente rápida (Manners, 1985).

Tatini et al. (1991) relataram a possibilidade da utilização da DEFT para a determinação da quantidade de microrganismos psicrófilos em leite cru, desde que a amostra a ser analisada seja submetida à processos de pré-incubação adequados.

Manners (1985) classifica como baixo o custo

por amostra de leite a ser analisada pela DEFT entretanto, é sempre importante lembrar a necessidade de um investimento inicial para aquisição dos equipamentos necessários para implantação da técnica

Apesar de ser mais prático e rápido que a metodologia padrão de contagem em placas, a técnica de epifluorescência direta necessita de técnicos especialmente treinados para a execução (Vasavada et al., 1993), uma vez que pode ser difícil a diferenciação das células viáveis das não-viáveis, principalmente devido à fadiga na leitura microscópica do litro pelo técnico responsável (Vasavada, 1993). Os microrganismos podem ser contados de forma automática por programas de análise de imagens, dispensando o trabalho manual de operação (Pettipher et al., 1980).

Outra solução para esse problema é a utilização de equipamentos que realizam a leitura automaticamente, como a citometria de fluxo, que é uma técnica de automação em microbiologia de alimentos que permite a quantificação de microrganismos em um tempo extremamente rápido.

A citometria de fluxo emprega a técnica de epifluorescência direta, onde a amostra tratada com alaranjado de acridina é aspergida em um disco rotacional através de microseringa. Cada célula microbiana corada emite luz vermelha quando excitada por luz xenon e essa emissão é registrada pelo aparelho. A grande vantagem da técnica é o tempo de leitura: após os 30 minutos iniciais necessários para o tratamento da amostra, a contagem é realizada em apenas um minuto.

No Brasil pouco se utiliza essa técnica na rotina industrial, nem em laboratórios de controle de qualidade. No entanto, já há no país alguns aparelhos que empregam a citometria de fluxo, e que, devido ao alto custo, só são viáveis para grandes indústrias.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A carga microbiana do leite produzido no Brasil, a constituição de sua microbiota, bem como o princípio de cada método, são fatores que influenciam o desempenho de métodos rápidos para contagem de MAM (Beloti et al., 1999a).

Pesquisas prévias já demonstraram algumas dificuldades na implantação de métodos alternativos de contagem de aeróbios mesófilos na indústria láctea brasileira, por apresentarem contagens menores quando comparados com a metodologia tradicional (Beloti, 2000).

Esses resultados parecem ser quase uma

exclusividade do leite brasileiro, e estão relacionados a características intrínsecas à produção e/ou beneficiamento do leite aqui produzido.

Por outro lado, os métodos para enumeração de coliformes apresentam bom desempenho, provavelmente por utilizarem a tecnologia do substrato definido que confere maior especificidade a esses métodos, quando comparados com os tradicionais (Beloti, 2000).

Na indústria láctea brasileira, com possíveis exceções, predomina a mão de obra de baixo custo e com pouca qualificação, o que pode ser um problema na execução de técnicas microbiológicas tradicionais. Nos métodos rápidos, entretanto, a simplicidade das operações, o menor número de etapas no preparo do material e, conseqüentemente

menor manipulação, facilitam muito a execução das análises e diminuem a possibilidade de contaminação aumentando a precisão nas análises.

Segundo Franco & Landgraff (1996), a escolha da metodologia a ser adotada na realização de análises microbiológicas de um produto qualquer deve ser norteadas pelos seguintes parâmetros: precisão pretendida, custo, tempo de análise, aceitabilidade do método por órgãos oficiais e pela comunidade científica e simplicidade de operação. Independentemente do método selecionado, é extremamente importante que cada laboratório desenvolva programas de controle de qualidade laboratorial, com o objetivo de verificar a exatidão e a precisão dos dados obtidos e garantir que sejam adequados para uma tomada de decisão.

MERO, L. A.; BELOTI, V.; SARROS, M. A. F. Rapid and automated methods for indicators microorganisms enumeration in milk - use in Brazil. *Semina: Ci. Agrárias*. Londrina, v. 21, n. 1, p. 115-126, mar. 2000.

ABSTRACT: This review describes the main rapid and automated methods used for indicators microorganism enumeration in milk, discussing their adequacy or inadequacy in Brazilian dairy industry.

KEY WORDS: milk, dairy microbiology rapid methods.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. (AOAC) 15 ed. Arlington: AOAC, 1990.

BAKER, W.; DAVIS, J.G.; LEEDS, W. G. et al. The synthesis and standardization of sodium resazurin for testing the hygienic quality of milk. *Proceedings of the Biochemical Society*. v. 36. 1943.

BARROS, M.A. R.; BELOTI, V.; NUNES, M. P.; et al. Utilização do ReadyCult™ LMX na técnica dos tubos múltiplos para enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* em leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 20. 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, (1999). p.381-381.

BELOTI, V. *Fatores que podem influenciar no desempenho de métodos rápidos para enumeração de microrganismos indicadores de higiene em leite pasteurizado*. São Paulo. 2000. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de SÃO Paulo.

BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M.; BARROS, M. A. F. et al, Influência da microbiota do leite no desempenho do Petrifilm™ AC para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. *Anais...*, Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999a. v.1, p.380-380.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREITAS, J. C. et al. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Rev. Bras. Microbiol.*, v. 30. n.2, p.137-140, 1999b.

BELOTI, V.; BARROS, M.A. F.; FREIRE, R. L. et al. Evaluation of physicochemical and microbiological characteristics of pasteurized milk types commercialized in Londrina city, Paraná, Brazil. *Epidemiol. Santo Anim.*, n. 311, p.04-50. 1997.

BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. Avaliação do ColiSure™ para enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em leite, *Revista de Farmácia e Bioquímica da USP*, v.33, n.2, p.34, 1997.

BEAUCHAT, L.R.; COPELAND, F.; CURIALE, M.S. et al. Comparison of the SimPlate™, Total Plate Count Method with Petrifilm™, Redigel™, and Conventional Pour-plate Methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. *J. Food Prot.*, v.61. n.1. p.14-16, 1998.

BIGALKE, D. Methods used for monitoring the microbiological quality of raw milk. Part I. *Dairy Food Sanitation*, v.4, n.5, p. 139-190, 1984.

BIOCONTROL. IDEXX Laboratórios. Inc. and BioControl Systems, Inc. Disponível em: <<http://www.rapidmethods.com/biocontrol>> 25 maio 2000.

- BISHOP. J.R.; JUAN. J.V. Improved methods for **quality** assessment of raw milk. *J. Food Prot.*, v. 51, n.12, p.955-957, 1933.
- BRAMLEY. A. J.; MCKINNON. C. H. in: ROBINSON. R. K. *Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk*. 2. ed., London: Elsevier Science. 1990. v. 1. cap. 5. p. 163-207.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MARA). *Regulamentos da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal*. Brasília, 1997.
- CAMARGO, M.J.; SOUZA. I.L.; PUZYNA. L.P. et al., Avaliação dos surtos e doenças veiculadas por alimentos no Estado da Paraná entre 1978/1998. Curitiba; Instituto de Saúde do Paraná. 1998.
- 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*. v.64. n.3. p.208-211. 1991.
- COVERT, T.C.; SHDIX. L.C.; RICE. E.W. et al. Evaluation of total Coliforms. *Applied and Environmental Microbiology*. V.5-2. n. 10, p.2443-2447, 1989.
- CURIALE. M.S.; FAHEY. P. Dry rehydratable Films for enumerating coliforms and aerobic bacteria in dairy foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.72, n.2, p.312-313. 1989.
- CURIALE. M.S.; SONS, T.; McIVER, D. et al. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Foods: collaborative study *J. ASSC. Off. Anal. Chem.* v.74. n.4, p. 1535-1543. 1991.
- FERIYANDEZ-ASTORGA, A.; HIJARRUBIA. M. J.; LÁZARO, B. et al. A useful and rapid method to recover bacterial cells from milk samples for microscopic count. *Journal of Microbiological Methods*. n. 24, p. 111-115, 1995.
- FRANCO, B.D.G.de M.; LANDGRAF, M, *microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996.
- FUNG, D. Y. C. *Handbook of rapid methods and automation in microbiology workshop*. Manhattan, KS: Kansas State University, 1996.
- GALE. P.; EROSERG. P. J. Evaluation of a rapid, defined substrate technology method for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in chlorinated drinking water. *Letters in Applied Microbiology*. v.17, p.200-3. 1993.
- GILCHRIST, J. E.; CAMPBELL, J. E.; DONNELLY, C. B. Spiral plate method for bacterial determination. *Appl. Microbiol.* v.25, p.244-252, 1973.
- GINN. R.E.; PACKARD. V.S.; FOX. T.L. Enumeration of total bacteria and coliform in milk by dry rehydratable film method: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.69, p.527-571, 1935.
- GINN. R.E.; PACKARD, V. S.; FOX, T.L. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for determining numbers of bacteria in raw milk. *J. Food Prot.* v. 47, n.10, p. 753-756, 1934.
- HOLLEY, R.A.; SMITH, S. M.; KEMPTON, A. G. Rapid measurement meat quality by resazurin reduction. 1, Factors affectin test validity. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment*, v.10. n.3, p. 153-157, 1977.
- MANNERS. J. G. Trends in microbiological testing of milk and dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*. v.40. n. 2. p. 70-75. 1985.
- MANNINEN. M. T.; FÜNG, D. V C; HART. R. A. Spiral system and laser colony scanner for enumeration of microorganisms. *Journal of Food Safety*. V.11, p.177-187, 1991.
- MCIVER. D.E. et al. Efficacy of Petrifilm™ *E. coli* Count Plates for *E. coli* and coliform enumeration. *J. Food Prot*, v.53. n.2. p. 145-150. 1990.
- McALLISTER. J.S.; RAMOS, M.S.; FOX. T.L. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for enumerating bacteria in processed fluid milk samples. *Dairy and Food Sanitation*. v.7. n.12. p.(532-635. 1937.
- NADER FILHO, A.; AMARAL. L. A.; ROSSI JÚNIOR. O. D. et al. Bacterial analysis of commercial pasteurized type C milk distributed in town of Jaboticabal-SP. *Ars. Veterinária*. v.5. p.263-268, 1998.
- NELSON, C.L.; FOX, T.L.; BUSTA, F.F. Evaluation of dry medium film (Petrifilm™ VRB) for coliform enumeration. *J. Food. Prot.* v.47, n.10, p.2443-2447, 1989.
- NERO, L. A. *Avaliação do desempenho do Simplate Total Plate Count Color Sndic&ivr (TPC CL) para enumeração de aeróbios mesófilos em leite pasteurizado*. Londrina. 2000. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) — Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Universidade Estadual de Londrina.
- PELLER, J. T.; GILCHRIST. C. B.; DONNELLY. C. E. et al. A collaborative study of the spiral plate method for examining milk samples. *Journal of Food Protection*. v. 40. p. 462-404, 1977.
- PETTIPHER, G. L; MANEELL, R.; MCKINNON, C.H. et al. Rapid membrane filtration — epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*. v.39, n.2. p.423-429. 1990.
- PITON, C.; GRAPPIN. R. A model for statistical evaluation of precision parameters of microbiological methods: application to dry rehydratable film methods and IDF reference methods for enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliforms in raw milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* v.74. n.1, p.92-103. 1991-
- SGNYK. G.F.; KOZLOWSKF, NOAR, P.S. et al. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. *J. Dairy Science*. v.70. p-1152-1155. 1937.
- SMITH, C. F.; TOWNSHEND, D. E. A new medium determining the total plate count. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* v.62. n.12. p.1404-1410. 1999.
- TATINI, S. R.; MEKALA, P.; EL-HABAZ. A.; GRIFFITHS, M. W. Rapid detection of psychrotrophic bacteria in manufacturing grade raw milks. *Journal of Food protection*. v. 54. n. 11. p. 361-657, 1991.
- THOMAS, S.B.; THOMAS. B.F. In: *Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk*. 2. ed. London/New York: Elsevier Science. 1990. v. 1. cap. 5; p. 163-297.
- TORTORELLO. M. L. ; STEWART, D. S. Antibody direct epifluorescent filter technique for rapid direct enumeration

- of *Escherichia coli* O 157:H7 in beef. *Applied and Environmental Microbiology*. v 60, n.11, 1993.
- TOWNSEND. D. E.; IRWING. R.L.; NAQUI. A. Comparison of the SimPate coliform and *Escherichia coli* Test with Petrifilm. three-lube MPN, and VRBA + MUG Methods for enumerating coliform and *E. coli* in food. *J. Food Prot.*, v.61, n. 4, p.444-449. 1999.
- TOWNSEND. D.E.; NAQUI. A. Comparison of the SimPlate™ Total Plate **Count** Test with Plate Count Agar Method for detection and quantification of bacteria in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* v.81. n.3. p. 563-569. 1998-
- VANDERZANT. O; SPLITTSTOESSER, D. F. In: *Compendium Of Methods for The microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington. DC: American Public Health Association, 1992.
- VASAVADA, C. P. Rapid methods and automation in **dairy** microbiology. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.3101-3113. 1993.
- VASAVADA. P.C.; CHANDLER. R. E.; HULL. R.R. Evolving methodologies for microbiological examination of milk and dairy foods. *Dair. Food Dairy and Environ. Sanit.* v.13. n.9, p.510-515. 1993.
- VENKITANARAYANAN. K. S.; FAUSTMAN, C.; HOAGLAND, T. **et al.** Estimation of spoilage **bacterial load on meal by fluorescein diacetate hydrolysis** or resazurin **reduction**. *Journal of Food Science*, v.62. n.3. p. 601-504. **19-97**.