

Volume 6 Número 1 Jan.-Mar. 1975

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

Revista de
Microbiologia
Volume 6 Número 1
Jan.-Mar. 1975

Jarras GasPak

**nova dimensão
no sistema**

BBL

para anaeróbios

As infecções devidas aos germes anaeróbios são muito mais frequentes do que deixam supor os exames de laboratório. De fato, estes germes foram mal conhecidos durante muito tempo, por ser bastante complicada a sua identificação nas condições utilizadas até agora.

Hoje, o sistema BBL oferece simplicidade de trabalho e segurança nos resultados desses exames, imprescindíveis em todos os laboratórios pela multiplicidade de aplicações que representam, sejam na clínica, no ensino, na pesquisa ou na indústria.

PRINCÍPIO

As jarras GasPak permitem a obtenção de uma anaerobiose perfeita, numa hora, sem auxílio de qualquer aparelho anexo. Em policarbonato, material transparente, autoclavável, realizam as condições ótimas de higiene e visualidade. Os envelopes GasPak são geradores de hidrogênio e de gás carbônico que permitem realizar, sem bomba de vácuo, uma atmosfera inerte no interior da Jarra Anaeróbia.

Os dois componentes de base são:

- Um gerador de hidrogênio + um gerador de gás carbônico.
- Um catalisador de paládio agindo à temperatura ambiente.

Por adição de 10 ml de água no envelope GasPak, há desprendimento de hidrogênio e gás carbônico. Sob o efeito do catalisador, o hidrogênio reage com o oxigênio do ar presente na jarra, para formar água; cria-se assim uma atmosfera anaeróbia.

O gás carbônico produzido favorece a multiplicação de certos microorganismos que se desenvolveriam mal ou seriam inibidos na ausência deste gás. Um indicador constituído por uma banda de papel de filtro embebida numa solução de azul de metileno, permite controlar visualmente a anaerobiose.

Para maiores detalhes, consultar o nosso

Departamento de Microbiologia.

BIOLAB-MÉRIEUX
PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA

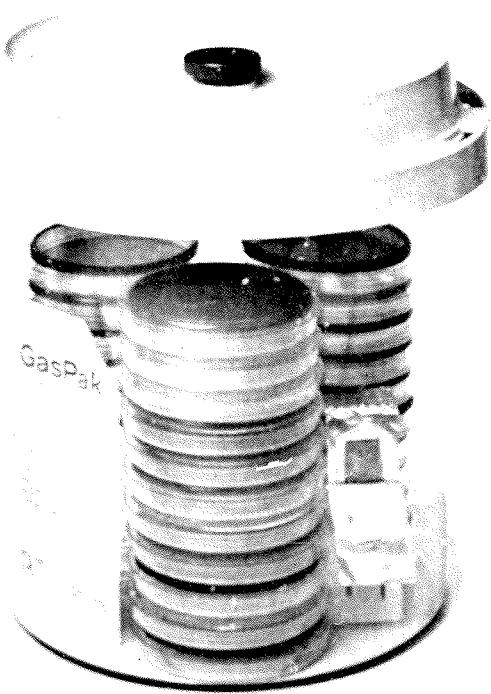
Rua do Resende, 96-A – Gr. 201 e 202. Tels.: 221-4089 e 242-0050

Rio de Janeiro, Gb. – 20.000 – ZC-06

São Paulo – Brasília – Porto Alegre – Niterói – Recife



JARRA ANAERÓBIA "100"



JARRA ANAERÓBIA "150"



Revista de Microbiologia

**Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil**

Conselho Editorial Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Editor João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Editores Associados Antônio F. Pestana de Castro e Sílvio A.C. Camba

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 120,00 para o Brasil; US\$ 20.00 (via marítima) ou US\$ 25.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 30,00 para o Brasil e US\$ 6.50 (via aérea) ou US\$ 5.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques ou ordens de pagamento em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Editor.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US\$ 20.00 (surface mail) or US\$ 25.00 (air mail). Single copies: US\$ 6.50 (air mail) or US\$ 5.00 (surface mail). Checks or money orders for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Editor's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Gobert A. Costa, Presidente. Cláudio A. Jürgensen, Vice Presidente. Flávio Alterthum, Secretário Geral. João S. Furtado, Tesoureiro.

Conselho Científico Amadeu Cury, Augusto E. Taunay, A. Monteiro Filho, Carlos da Silva Lacaz, Ciro A. Peluffo, Dácio de A. Christóvão, Dirce Franco de Araujo, Eduardo O. Cisalpino, Gobert A. Costa, Homero S. Jobim, Jandira Planet do Amaral, João Xavier Viana, José Noronha Peres, José Oliveira de Almeida, Lúcio P. de Carvalho Lima, Luiz Siqueira Carneiro, Milton Fontes Magarão, Oswaldo G. de Lima, Otávio Barachini, Otto G. Bier, Paulo de Góes, Raymundo A.C. Moniz de Aragão, Seymour H. Hutner, Werner K. Maas.

Delegados Regionais ALAGOAS: Ayro Pontes Lima Bomfim (Maceió). AMAZONAS: Aurélia Lopes Castrillon (Manaus). BAHIA: Carlos Brenha Chaves (Salvador). CEARÁ: Eldair dos Santos Sátiro (Fortaleza). ESPÍRITO SANTO: Henrique Tommasi Netto (Vitória). GÓIAS: Maria Aparecida Muniz (Goiânia). GUANABARA: Altair Antunes Zebral (Rio de Janeiro) e Milton de Uzeda (Rio de Janeiro). MARANHÃO: Salomão Fiquene (São Luiz). MINAS GERAIS: Romain Rolland Goligher (Belo Horizonte). PARÁ: Zé Constante Lins (Belém). PARAÍBA: Maria Marluce Melo Vasconcelos de Castro (João Pessoa). PARANÁ: Alceu Schwab (Curitiba) e Luiz Parelha Ruiz (Londrina). PERNAMBUCO: Diva Montenegro Melo de Azevedo (Recife) e Marcelo Magalhães (Recife). RIO GRANDE DO NORTE: Maria Raquel dos Santos (Natal). RIO GRANDE DO SUL: Sérgio Job Jobim (Porto Alegre), Newton Neves da Silva (Porto Alegre) e Tabajara Gaúcho da Costa (Santa Maria). RIO DE JANEIRO: Cláudio Armando Jürgensen (Nilópolis). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcão (Araraquara). Vicente Correa Miranda (Araraquara), Augusto Cesar Montelli (Botucatu), Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto), Antônio Walter Ferreira (São Paulo), Waldyr Giorgi (São Paulo) e Edécio Maluf (Sorocaba). SERGIPE: Raimundo Mendonça de Araujo (Aracaju).

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX – Produtos para Laboratórios Ltda.

CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos

Eli Lilly do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 6 Janeiro-Março 1975 Número 1

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 6(1)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Extração e caracterização da hemolisina de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [Extraction and characterization of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hemolysin] — Heloisa R. Barbosa, I. Popper & L.P. de Carvalho Lima	1
Indicadores de contaminação bacteriana em louça de bares e restaurantes mantida em banho de água quente [Bacterial indicators of contamination from dishware exposed to heated baths in bars and restaurants] — Alexandre Adler Pereira, João Ramos Costa Andrade, Antonio Augusto F. Quadra, Elza F. de Oliveira & Italo Suassuma	8
Distribuição de fatores de resistência entre culturas de <i>Escherichia coli</i> isoladas do ceco de bovinos [Distribution of resistance factors among <i>Escherichia coli</i> from bovines] — Mabel Hanna Vance & Marcelo Magalhães	14
Modificação do ágar verde brilhante modificado para o isolamento de <i>Salmonellas</i> fermentadoras de lactose [Modification of brilliant green agar for detecting lactose-positive <i>salmonellae</i>] — Marcelo Magalhães & Adelma Véras .	16

Revisão

The bacteriology of fruit juices — J.G. Carr	18
--	----

JEOL DO BRASIL

JEOL DO BRASIL LTDA. Rua da Glória, 654 01510 São Paulo Telefone: 279-1032

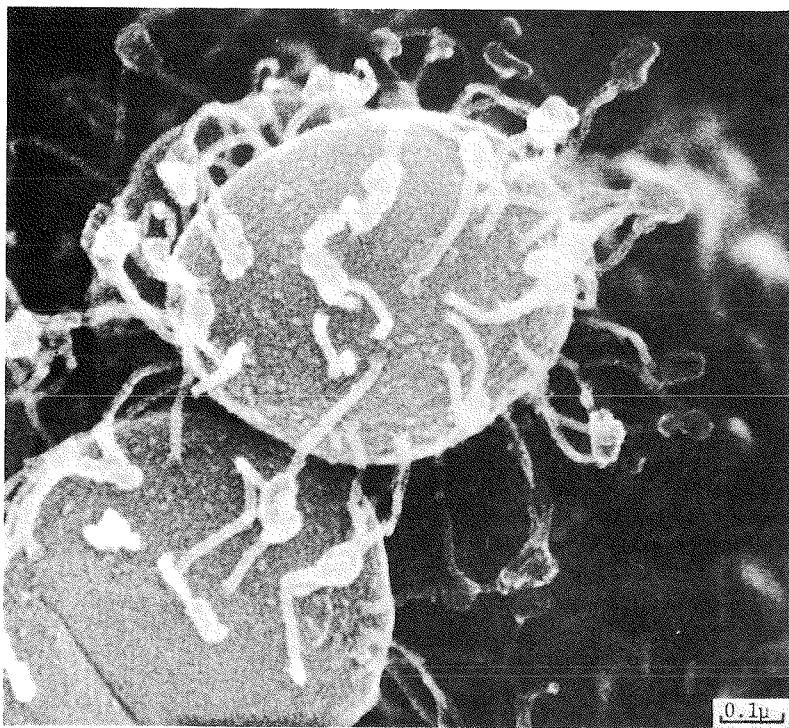


Imagen eletrônica secundária de fago Pφ55 adsorvido sobre *Staphylococcus*, obtida com JEM-100C, equipado com SEG e ASID.

Novo lançamento da JEOL: microscópio de varredura de mesa

JSM-P15



Resolução:

200Å

Aumentos:

30X – 50.000X

Modo de varrimento:

forma e linha

Estágio de amostra:

tipo de gaveta

Dimensões do espécime:

10mm diâm. x 10mm alt.

Movimentos:

X, Y = 15mm

Tubo de imagem:

120mm x 90mm CRT

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Editor da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Editores.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics*, 54: 61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.*, 241: 527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milimicro ($m\mu$) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6} m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9} m$), ao invés de milimicro ($m\mu$); e Angstroms (A ; $10^{-10} m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramos por mililitros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Berger's Manual of Determinative Bacteriology" (7^a ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Berger deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A **página-título** deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O **resumo** não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na seção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

WEISER, O.L. & EMERSON, J.S. — Selective screening for quantitative urine cultures.
Amer. J. clin. Path., 45:649-650, 1966.

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*.

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:

MILLER, S.E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retícula devem ser feitas em papel brilhante, com contraste adequado para reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob **TABELAS**. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente, 10 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Editor, correndo as despesas por conta dos interessados.

INTER LAB

Rua Dom Duarte Leopoldo, 707 — Telefone: 278-9703
Caixa postal 15 192 — Correio Cambuci
São Paulo SP

INTER LAB é uma nova empresa que tem como objetivo fornecer ao Brasil os mais avançados equipamentos e reagentes para laboratórios de análises clínicas e microbiológicas. A sua estrutura é completa, com laboratório de desenvolvimento de novos reagentes e equipamentos, fábrica e distribuição direta para o Brasil.

Os reagentes e equipamentos fornecidos são de alta qualidade, fabricados por empresas renomadas no mundo inteiro.

Distribuidores autorizados para o Brasil de:

DIFCO LABORATORIES (Estados Unidos) Pioneira mundial em bacteriologia

aminoácidos; anticorpos fluorescentes; antígenos e antissoros bacterianos; carboidratos; corantes; discos para antibiogramas e para diferenciação de peptonas; endotoxinas; enriquecedores; enzimas; indicadores; hidrolisados; meios de cultura desidratados e preparados para ensaios microbiológicos, métodos padrões, tecidos e vírus; produtos bioquímicos; reativos sorológicos e clínicos.

DIFCO LABORATORIES (Inglaterra) A mesma qualidade Difco em produtos especializados

- *produtos selecionados para microscopia óptica:* bálsamo do Canadá, Carbowax, corantes (Giemsa, hematoxilina, May-Grunwald, Papanicolau e uma linha completa de corantes em pó e em solução), clarificadores, DPX, fixadores, indicadores, material para montagem e vedação de lâminas, mordentes, óleo para imersão, parafina histológica, Polywax e outros produtos;
- *materiais fixadores e para montagem em microscopia eletrônica;*
- *produtos químicos diversos.*

PROPPER INTERNATIONAL (Estados Unidos) Precisão e qualidade garantidas

câmaras de Neubauer; lâminas e lamínulas; lancetas; pipetas para contagem de glóbulos brancos e vermelhos; pipetas de Sahli; termômetros químicos; torniquetes; tubos capilares com e sem heparina.

LABTEST (Brasil) Colorimetria avançada para análises químicas

ácido úrico; amilase; anticoagulantes; bilirrubina; cálcio; colesterol; cloretos; corantes para hematologia e eletroforese; creatinina; dehidrogenase láctica; ferro sérico; fosfatase ácida prostática; fosfatase alcalina; fósforo; glicose; lípidos totais; proteínas totais e albumina; timol; transaminases; triglicérides; uréia.

IVA — INDUSTRIA VIDRIERA ARGENTINA (Argentina) Última qualidade a preços sem concorrência

vidro de borosilicato, trabalhado com esmero: balões, buretas, Erlcnmeyers, pipetas, provetas.

ROLCO SRL — Qualidade a preço inigualável

agitadores; butiômetros; centrífugas clínicas e industriais; destiladores de água; microhematocritos.

Extração e caracterização da hemolisina de *Pseudomonas aeruginosa**^{*}

Heloisa R. Barbosa** , I. Popper & L.P. de Carvalho Lima

Resumo

Desenvolvimento de método de extração e purificação da hemolisina de *Pseudomonas aeruginosa*. O material empregado no preparo dos meios e nos processos de extração continham substâncias contaminantes, com atividade hemolítica, tornando-se necessário incluir etapas para sua eliminação. Para hemólise total da suspensão padronizada de glóbulos, são necessárias 33,53 μ g do material purificado. Métodos cromatográficos revelaram que a hemolisina é constituída do açúcar ramnose, ligado à ácidos graxos (palmitílico ou β -hidroxidecanóico e β -hidroxidodecanóico).

Summary

Extraction and characterization of Pseudomonas aeruginosa hemolysin

A new method for the extraction and purification of the hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. The materials used in the preparation of media and in the extraction methods were invariably contaminated with substances showing hemolytic activity. It was therefore necessary to include steps for the elimination of these contaminants. For total lysis of a standardised suspension of sheep red cells 33.53 μ g of purified material were necessary. Chromatographic analysis showed that the hemolysin consisted of a sugar (ramnose) and fatty acids (β -hidroxidecanoic or palmitic and β -hydroxidodecanoic).

Introdução

As células de *P. aeruginosa* são relativamente atóxicas e os filtrados do meio de cultura se apresentaram muito tóxicos para camundongos⁸. Isto revelou a importância dos produtos extracelulares na patogenia do germe. Vários autores passaram, então, a estudar as substâncias excretadas pelos germes, em particular, enzimas extracelulares.

Em 1900, Bullock & Hunter⁴ demonstraram que filtrados de cultura em caldo de 3 a 4 semanas eram capazes de lisar suspensões de eritrócitos e que placas de ágar sangue evidenciaram regiões de hemólise ao redor das colônias de *P. aeruginosa* (= *B. pyocinaeum*).

Alguns autores se propuseram a isolar a substância hemolítica. Liu¹⁶ descreveu um método de extração, obtendo a purificação parcial da substância. O mesmo autor¹⁷ modificou o método, sem, contudo, atingir o objetivo inicial.

Berk² determinou as melhores condições para a atividade da substância hemolítica e aventou a hipótese de se tratar de uma proteína ou uma substância composta por proteína mais outro material.

Bergström & col.¹ isolaram um produto de *P. aeruginosa*, denominado ácido piolípico, que inibia o consumo de O₂ por bacilos da tuberculose. A substância apresentava P.M. 500 e era composta por 1-ramnose e ácido β -hidroxidecanóico.

Jarvis & Johnson¹⁵ cristalizaram, a partir de meio líquido, uma substância altamente solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em água, de P.M. 650 e composta de duas moléculas de ramnose e duas de ácido β -hidroxidecanóico. Quanto à atividade biológica, os autores constataram ser bacteriostática para *Mycobacterium tuberculosis* e tóxica para camundongos. Posteriormente, Sierra²² demonstrou que o glicolipídio isolado por Jarvis & Johnson¹⁵ apresentava capacidade de lisar glóbulos vermelhos. O trabalho de Edwards & Hayashi⁷ confirmou a estrutura do glico-

* Baseado em parte de tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências, de H.R. Barbosa.

** Depto. de Bioquímica, Instituto de Química da USP, Caixa Postal 20780, 01000 São Paulo SP.

lipídio proposta¹⁵. Posteriormente, Murao & col.²¹ obtiveram, sob forma cristalizada, uma substância composta por duas moléculas de ramnose e duas de ácido β -hidroxidecanóico. Os autores compararam a substância por eles isolada à descrita¹⁵, apontando semelhanças e diferenças, sem contudo afirmar que se tratava do mesmo produto.

Para a obtenção de produto razoavelmente puro e estudo da atividade da hemolisina, foram empregadas as técnicas já descritas¹⁵. Não foi possível reproduzir a cristalização do produto, como descrito pelos autores, apesar de termos tentado variações na técnica original. Assim sendo, procuramos desenvolver um método que permitisse a obtenção da hemolisina tão pura quanto possível.

A principal dificuldade consistiu no fato de que tanto o material empregado na preparação dos meios de cultura, como as próprias drogas "pro analisi", utilizadas, continham quantidades, por vezes apreciáveis, de contaminantes capazes de, por si, provocarem a lise dos glóbulos vermelhos. Houve a necessidade, em várias etapas do processo, de eliminar, previamente, tais contaminantes.

Material e Métodos

Microrganismo — O microrganismo utilizado foi isolado de um caso fatal de meningite e, segundo provas bioquímicas, classificado como *P. aeruginosa*.

Seleção das colônias hemolíticas — O germe foi inoculado em placas de ágar sangue e, após 28 horas de incubação a 37°C, escolhidas, para prosseguimento do processo, as colônias que apresentassem nítida zona de hemólise β a seu redor.

Meio de cultura — As colônias selecionadas foram cultivadas, durante 60 horas a 37°C, no meio de Favorite & Hammon¹⁰ modificado:

Hidrolisado ácido de caseína	15g
Glicose	2,5g
H ₂ O q.s.p.	1000ml

Antes da inoculação do germe, o meio deve ser tratado com quatro volumes de clorofórmio-metanol 2:1 v/v para a extração de lipídios contaminantes. A fase aquosa, após a separação, é usada como meio de cultura.

Extração da hemolisina — Após o crescimento, as células são separadas por centrifugação e o sobrenadante utilizado para o prosseguimento da experiência.

O primeiro teste realizado é com o que se verificar a capacidade hemolítica do sobrenadante. Para tanto, testam-se quantidades crescentes do sobrenadante frente a glóbulos vermelhos de carneiro. As hemácias devem ser lavadas em tampão, até se obter o sobrena-

dante completamente límpido. A partir das células sedimentadas ("papa"), padroniza-se uma suspensão de modo que 0,5ml desta, ressuspensos em 3,5ml de água, apresentem absorbância de 0,200 a 550 nm.

A seguir, procede-se ao isolamento da substância. O sobrenadante ativo é extraído com quatro volumes da mistura clorofórmio-metanol 2:1 v/v. Após a separação das duas fases, a orgânica deve ser desidratada, por passagem em sulfato de sódio anidro, e seca em concentrador a vácuo. O material seco é pesado e ressuspendo em clorofórmio-metanol 2:1 v/v, na proporção de 1g para 20ml da mistura de solventes, segundo o método de Folch¹¹ modificado. Extraí-se várias vezes o material, com 0,2 volumes de água acidificada (30% HCl concentr. v/v), para a eliminação de piocianina. A fase orgânica, isenta do pigmento, é extraída com 0,2 volumes de KCl 0,36% e seca. Procede-se, então, a uma suspensão em éter e o precipitado que se forma é desprezado, por ser inativo. O sobrenadante é seco em banho maria, a 55°C, pesado e sua atividade hemolítica verificada.

Purificação — A purificação do material é feita através de sua aplicação em placas preparativas de sílica gel GF 254 (fluorescente), a fim de se eliminar os ácidos graxos contaminantes. Antes de serem usadas, as placas são aquecidas a 100°C por 1 hora. O solvente utilizado é a mistura de hexano : dietil éter : ácido acético 70:30:1 v/v/v¹⁴.

Após a corrida, as manchas contendo os diferentes materiais são reveladas através de luz ultra-violeta, sendo em seguida removidas da placa, juntamente com a sílica. As substâncias são separadas da sílica através de várias lavagens com éter. A seguir, procede-se a dosagem de açúcar⁶ e da atividade hemolítica de cada uma das manchas separadas.

A substância que apresentar maior atividade hemolítica deverá ser novamente purificada por cromatografia em camada delgada. O solvente, agora utilizado, é a mistura de clorofórmio : metanol : H₂O 75:22:3 v/v/v¹⁸. A revelação e a extração do material é feita como foi descrito acima. Mede-se a atividade hemolítica e o material ativo é re-purificado por cromatografia em camada delgada, usando-se o mesmo sistema de solventes.

Caracterização — As dosagens do material hemoliticamente ativo, pelo método de Dubois⁶, revelaram a presença de açúcar. Para a identificação dos açúcares, o material foi submetido à hidrólise ácida, por duas horas, com ácido clorídrico, na concentração final de 2N. Depois de hidrolisado, o material é lavado várias vezes com etanol. A seguir, é feita cromatografia descendente, em papel, utilizando-se a seguinte mistura de solventes: n-butanol : piridina : água 3:1:1 v/v/v¹³. O tempo de corrida é de 30 horas, em papel Whatman nº 1, e revelação com reagente de nitrato de prata²³.

Além da análise de açúcares, o material é submetido à identificação de ácidos graxos, por saponificação pela seguinte metodologia²⁰: ao material seco, adiciona-se 0,5ml de solução saturada de KOH e 1,0ml de etanol absoluto, saponificação a 90°C, por 30 minutos e em seguida resfriamento no gelo e acidificação com 0,86ml de HCl concentrado. O sal que se formar é dissolvido em 2,0ml de água e a amostra extraída três vezes com 5,0ml de n-hexano, para a remoção de ácidos graxos saturados e insaturados. Esta fase orgânica é novamente extraída três vezes com água. A fase aquosa deve ser extraída três vezes, com mistura de éter-hexano 1:2 v/v para a remoção de ácidos graxos β-hidroxilados (Pullman, N., comunicação pessoal). A fase aquosa é desprezada e as fases orgânicas secas sob corrente de nitrogênio. Através do método de Metcalf & Schmitz¹⁹, o material é devidamente metilado, antes de ser identificado por cromatografia em fase gasosa, a qual é feita em cromatógrafo equipado com detector de ionização de chama. A coluna deverá conter, como fase estacionária, 20 partes de dietile-noglicol-succinato (DEGS) e, como suporte, 80 partes de cromosorb W; como gás de arraste, foi utilizado nitrogênio. O cromatograma foi desenvolvido a 170°C.

Resultados

O primeiro teste, feito com o sobrenadante da cultura, para se verificar a presença de substância hemolisante, deu os resultados mencionados na Tabela 1.

Verificada a atividade do sobrenadante, procedeu-se à extração do material. O rendimento obtido, após a extração, variou de 100 a 300mg de substância bruta, para dois litros de cultura.

Na Tabela 2 estão os resultados da hemólise obtidos com esse material.

A Figura 1 demonstra a disposição das manchas no cromatograma em camada delgada preparativa do material bruto. A finalidade desta etapa era a eliminação de ácidos graxos contaminantes.

Após a cromatografia, foram determinadas a atividade hemolítica e a quantidade de açúcar de cada uma das manchas separadas. Os resultados estão expressos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

A comparação entre os dados obtidos para as várias manchas forneceu evidências quanto à localização do material hemolisante, indicando que o mesmo se achava concentrado na mancha 1.

Tabela 1

Sobrenadante (ml)	Tampão fosfato (ml)	Suspensão de hemácias (ml)	Hemólise Meio cultivado	Hemólise Meio não cultivado
0,25	3,25	0,50	-	-
0,50	3,00	0,50	+	-
0,75	2,75	0,50	+	-
1,00	2,50	0,50	+	-
1,50	2,00	0,50	+	-
2,00	1,50	0,50	+	-

Tabela 2

Hemólise com o material bruto após extração do meio de cultura

Tubos	Peso da Substância (μg)	% em peso da Substância	Tampão Fosfato (ml)	Suspensão de hemácias (ml)	% Hemólise
1	8,5	0,0217	3,5	0,5	0,0
2	17,0	0,0425	3,5	0,5	0,0
3	20,4	0,0500	3,5	0,5	2,6
4	25,5	0,0637	3,5	0,5	2,6
5	28,9	0,0722	3,5	0,5	3,2
6	34,0	0,0850	3,5	0,5	5,3
7	37,4	0,0935	3,5	0,5	99,4
8	42,5	0,1062	3,5	0,5	100,0
9	-		3,5	0,5	

Tabela 3

Capacidade hemolítica das substâncias separadas por cromatografia em camada delgada referidas na Figura 2

Mancha	Peso da Substância (μg)	% em peso da Substância	Tampão Fosfato (ml)	Suspensão de hemácias (ml)	% Hemólise
1	14,37	0,0376	3,5	0,5	5,1
1	19,16	0,0479	3,5	0,5	9,6
1	23,95	0,0598	3,5	0,5	67,7
1	28,74	0,0718	3,5	0,5	96,9
1	33,53	0,0838	3,5	0,5	100,0
2	23,70	0,0590	3,5	0,5	0,0
2	47,40	0,1136	3,5	0,5	3,2
2	73,60	0,1840	3,5	0,5	61,2
3	24,42	0,0610	3,5	0,5	11,6
3	48,84	0,1221	3,5	0,5	22,5
3	73,26	0,1831	3,5	0,5	34,1
4	25,00	0,0625	3,5	0,5	3,2
4	50,00	0,1250	3,5	0,5	12,9
4	75,00	0,1875	3,5	0,5	14,8

Tabela 4

Dosagem de açúcar nas substâncias separadas por cromatografia em camada delgada referidas na Figura 1

Mancha	Peso (μg)	H ₂ O (ml)	Fenol (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	A (490nm)	Quantidade de açúcar (μg)
1	71,85	0,98	1,0	5,0	0,065	6,933
1	143,70	0,97	1,0	5,0	0,140	14,932
2	71,10	0,98	1,0	5,0	0,000	0,000
2	142,20	0,97	1,0	5,0	0,015	1,599
3	73,26	0,98	1,0	5,0	0,009	0,959
3	146,52	0,97	1,0	5,0	0,008	0,853
4	75,00	0,98	1,0	5,0	0,000	0,000
4	150,00	0,97	1,0	5,0	0,017	1,813
Branco	—	1,00	1,0	5,0	0,000	—

Deste modo, através de cromatografia em camada delgada, prosseguiu-se com a purificação da mancha 1. Os resultados obtidos, após a corrida, estão representados na Figura 2.

As manchas obtidas nesta segunda cromatografia em camada delgada foram recromatografadas, com o mesmo sistema de solventes, até que se apresentassem puras. Em seguida, foram feitas dosagens da atividade hemolítica e da quantidade de açúcar (Tabelas 5 e 6).

Com o material isolado na mancha 3', foram identificados açúcares e ácidos graxos.

Através de cromatografia em papel, o açúcar foi identificado como ramnose.

A cromatografia em fase gasosa revelou a presença de uma substância com o mesmo tempo de retenção que o do ácido palmítico ou do ácido β -hidroxidecanóico (o tempo de retenção é igual para esses dois ácidos graxos). Porém, ainda apareceu um pico correspondente ao ácido β -hidroxidodecanóico e alguns muito pequenos, não identificáveis com nenhum ácido graxo.

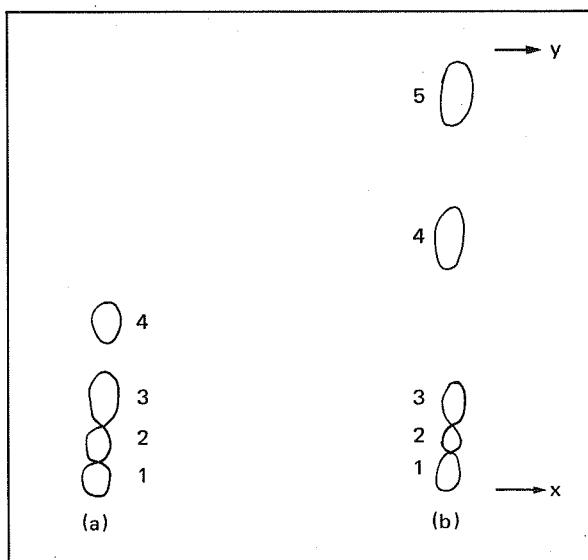


Figura 1 — Cromatografia em camada delgada, para a separação de ácidos graxos contaminantes. Solvente: n-hexano : éter dietílico : ácido acético, 70:30:1, v/v/v. a) Manchas obtidas após a corrida do extrato bruto do meio cultivado. b) Extrato bruto do meio não cultivado, cromatografado nas mesmas condições.

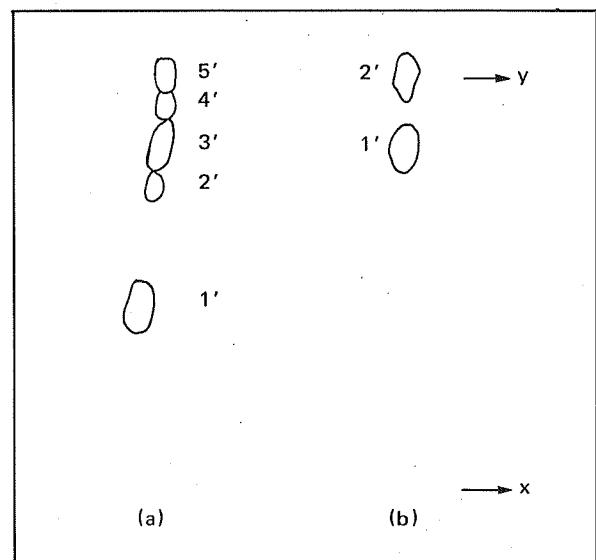


Figura 2 — Cromatografia em camada delgada, da mancha 1, obtida em cromatografia anterior. Solvente: clorofórmio : metanol : água, 75:25:3, v/v/v. a) Meio cultivado. b) Meio sem cultivo.

Tabela 5

Capacidade hemolítica das manchas obtidas por cromatografia em camada delgada (Fig. 2)

Mancha	Peso (μg)	% em peso da Substância	Tampão (ml)	Suspensão de hemácias (ml)	% hemólise
1'	20	0,0500	3,5	0,5	34,5
1'	92	0,2300	3,5	0,5	90,3
2'	25	0,0625	3,5	0,5	61,2
2'	90	0,2250	3,5	0,5	96,9
3'	21	0,0525	3,5	0,5	100,0
3'	91	0,2275	3,5	0,5	100,0
4'	21	0,0525	3,5	0,5	0,0
4'	96	0,2400	3,5	0,5	0,0
5'	25	0,0625	3,5	0,5	0,0
5'	100	0,2500	3,5	0,5	0,0

Tabela 6

Dosagem de açúcar das substâncias separadas por cromatografia em camada delgada (Fig. 2)

Mancha	Peso (μg)	H ₂ O (ml)	Fenol (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	A (490nm)	Quantidade de açúcar (μg)
1'	80	0,98	1,0	5,0	0,100	11,43
2'	75	0,98	1,0	5,0	0,115	13,14
3'	136	0,98	1,0	5,0	0,320	36,57
4'	96	0,98	1,0	5,0	0,030	3,43
5'	100	0,98	1,0	5,0	0,020	2,29

Discussão

Quando nos propusemos a estudar alguns aspectos de hemolisina de *P. aeruginosa*, uma das preocupações iniciais foi compará-la a hemolisinas de outros germes, já descritas e caracterizadas. Entre as principais, havia as estreptolisinas *O* e *S*, produzidas por estreptococo hemolítico e caracterizadas como proteínas^{5, 12}.

Tomando como base os trabalhos de Berk³ e de Liu¹⁷, iniciamos a purificação do produto como se fosse uma proteína.

Logo, acumularam-se evidências descartando a idéia de que se tratasse de uma molécula proteica. A manutenção do material sob diferentes condições de temperatura, a -20°C, 0°C, 23°C, 29°C e 37°C, por 24 horas, não alterava sua atividade. O material não se inativava após fervura a pH3,0 por 10 minutos. A crescente insolubilidade, com formação de emulsão, à medida em que se concentrava o material e, finalmente, seu tratamento com pronase, por 24 horas, não resultando em perda da atividade hemolítica, fez com que fosse completamente abandonada a idéia de se tratar de uma proteína.

Foram, então, adotadas técnicas para a extração de lipídios, após as indicações práticas sugeridas principalmente nos trabalhos de Jarvis & Johnson¹⁵ e Sierra²².

O grande problema que surgiu foi o da atividade hemolítica que aparecia em extratos do meio de cultura, sem cultivo prévio, devida ao fato de várias substâncias, como ácidos graxos, serem capazes de lisar glóbulos vermelhos. Substâncias desse tipo, contaminantes dos ingredientes do meio de cultura, interferiam nos resultados. Para contornar o problema, passamos a extraer o meio, antes da cultura, com solventes orgânicos, a fim de retirar essas substâncias. Paralelamente à extração do material produzido pelas bactérias, foi feita a extração, a partir do meio de cultura sem cultivo, para comparação.

A metodologia foi alterada, durante a fase experimental, por problemas de contaminação de materiais ou por degradação de substâncias. A sílica gel G, por exemplo, apresentava contaminantes que eram extraídos com os solventes orgânicos, utilizados no método, e os vapores de iodo, utilizados como reveladores das manchas cromatografadas, degradavam-nas. As dificuldades foram contornadas pela utilização de sílica gel GF-254, revelando-se o material por fluorescência em luz ultra-violeta.

A cromatografia em camada delgada iniciava o processo de purificação. O sistema de solventes usado era próprio para separar ácidos graxos de glicolipídios, os quais permaneciam na base de aplicação. A recuperação do material separado apresentou rendimento de 50%.

Pelas análises dos resultados, é possível verificar

que toda a atividade hemolítica devida à hemolisina se concentrava na mancha 1. Acreditamos que a atividade da mancha 2 era devida a uma contaminação pela mancha 1, uma vez que ambas se localizavam muito próximas no cromatograma.

Isolada a mancha 1, o material nela contido era separado por cromatografia em camada delgada, utilizando-se outro sistema de solventes, próprio para a separação de glicolipídios.

As manchas 1' e 2', após re-purificação, se mostraram inativas. As manchas 4' e 5' não lisavam glóbulos vermelhos. Restava a mancha 3', que era realmente ativa. Procedeu-se a re-purificação desse material, cuja identificação parcial revelou a presença do açúcar ramnose, em todas as fases de purificação.

A análise de ácidos graxos demonstrou a existência de um pico principal, cujo tempo de retenção era igual ao do ácido β -hidroxidecanóico e do ácido palmítico, e um secundário, correspondendo ao pico do ácido β -hidroxidodecanóico e alguns picos pequenos que não puderam ser identificados. Apesar de ter sido utilizado método que separaria ácidos graxos saturados e insaturados de ácidos graxos β -hidroxilados, obteve-se gráfico igual para as duas fases. Provavelmente, a pequena quantidade de material obtido após a hidrólise e metilação facilitou a contaminação cruzada durante a extração.

Toda a metodologia para extração, purificação e identificação empregada para o meio onde as bactérias haviam sido cultivadas, também o foi para o mesmo meio, sem cultivo prévio. Este apresentava baixa atividade hemolítica, quando concentrado, mesmo após a extração prévia com clorofórmio-metanol. A análise de açúcares em várias fases da purificação não revelou a presença de ramnose. Quanto aos ácidos graxos, a cromatografia a gás revelou a presença de vários picos de pequenas dimensões, tendo dois deles apresentado tempos de retenção iguais, respectivamente, ao do ácido palmítico ou do β -hidroxidecanóico e outro do β -hidroxidodecanóico.

Assim, apesar da extração prévia, uma pequena atividade lítica ainda permanecia após a concentração do meio devido a presença de alguns ácidos graxos, conforme tivemos oportunidade de verificar, tem apreciável capacidade de lisar glóbulos vermelhos.

Os mesmos ácidos graxos foram encontrados fazendo parte integrante da molécula de hemolisina, associados a ramnose. A diferença na quantidade presente no extrato da cultura e no meio não semeado mostra que a hemolisina não é formada por incorporação de material e sim por síntese a partir dos nutrientes oferecidos ao germe.

Por outro lado, como não é possível pelo exame do cromatograma distinguir entre o pico formado pelo ácido palmítico e pelo ácido β -hidroxidecanóico, poder-se-ia supor que os ácidos presentes no meio não cultivado ou extrato da cultura fossem diversos.

Referências Bibliográficas

1. BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H. & DAVIDE, H. — On a metabolic product of *Ps. pyocyannea*, pyolipic acid, active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ark. Kemi, Mineral. Geol.* (Stockholm) 23A:1, 1947.
2. BERK, R. — Production and characterization of *Ps. aerug.* hemolysin. *J. Bact.*, 84:1041, 1962.
3. BERK, R. — Partial purification of the extracellular hemolysin of *Ps. aerug.* *J. Bact.*, 88:559, 1964.
4. BULLOCK, W. & HUNTER — Ueber Pyocyanolysin, eine haemolytische Substanz in Culturen des *Bacterium pyocyanum*. *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.* (Stuttgart), 28:865, 1900.
5. CINADER, B. & PILLEMER, L. — Purification and properties of Streptolysin S. *J. exp. Med.*, 92:219, 1950.
6. DUBOIS, M.; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. — Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* (Wash.), 28:350, 1956.
7. EDWARDS, J.R. & HAYASHI, J.A. — Structure of a Rhamnolipid from *Ps. aerug.* *Arch. Biochem.*, 111:415, 1965.
8. ELROD, R.P. & BRAUN, A.C. — A phytopathogenic bacterium fatal to laboratory animals. *Science*, 94:520, 1941.
9. ESSELMANN, M.T. & LIU, P.V. — Lecithinase production by gram negative bacteria. *J. Bact.*, 81:939, 1961.
10. FAVORITE, G.O. & HAMMON, W.M. — The Production of *Staphylococcus* Enterotoxin and alpha Hemolysin in a simplified medium. *J. Bact.*, 41:305, 1941.
11. FOLCH, J.; LEES, M. & STANLEY, S. — A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. biol. Chem.*, 226:497, 1956.
12. HERBERT, D. & TODD, E.W. — Purification and properties of a Haemolysin produced by Group A Haemolytic Streptococci (Streptolysin O). *Biochem. J.* (London), 35: 1124, 1941.
13. HOUGH, L.; JONES, J.K.N. & WADMAN, W.H. — Quantitative analysis of mixtures of sugar by the method of partition chromatography. Part. V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. *J. Chem. Soc. (London)*, 1702, 1950.
14. IONEDA, T.; LEDERER, E. & ROZANIS, J. — Sur la structure des diesters de Tréhalose ("cord Factors") produits par *Nocardia Asteroides* et *Nocardia Rhodochrous*. *Chem. Phys. Lip.* (Amsterdam), 4:375, 1970.
15. JARVIS, F.G. & JOHNSON, M.J. — A Glyco-Lipide produced by *Ps. aerug.* *J. Amer. Chem. Soc.*, 71:4124, 1949.
16. LIU, P.V. — Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonas*. *J. Bact.*, 74:718, 1957.
17. LIU, P.V.; ABE, Y. & BATES, J.L. — The roles of various fractions of *Ps. aerug.* in its pathogenesis. *J. Infect. Dis.* (Chicago), 108:218, 1961.
18. MANGOLD, H.K. — Aliphatic lipids. In: STAHL, E. — *Thin layer chromatography*. New York, Springer, 1965. p. 137—186.
19. METCALFE, L.D. & SCHMITZ, A.A. — The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analyt. Chem.*, 33:363, 1961.
20. MONROY, G.H. — Fatty acid synthesis in rat liver mitochondria. Nova York, 1968. Dissertação de Mestrado — Faculty of the Graduate School of Arts and Science.
21. MURAO, S.; YANG, C.; ARAI, M. & OMATA, S. — Studies on the utilization of n-Alkane by *Ps. aerug.* AJ-3145. II. Structure of antimicrobial activity of a glycolipid from *Ps. aerug.* AJ-3145 — *Bull. Univ. Osaka Pref., Ser B* (Sakai), 22:29, 1970.
22. SIERRA, G. — Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Ps. aerug.* Antonie v. Leeuwenhoek. *J. Microbiol. Serol.* (Amsterdam), 26:189, 1960.
23. SMITH, I. — *Chromatographic techniques*. Londres, William Heinemann Medical Books, 1958, p. 164.

Indicadores de contaminação bacteriana em louça de bares e restaurantes mantida em banho de água quente*

Alexandre Adler Pereira, João Ramos Costa Andrade,
Antônio Augusto F. Quadra**, Elza F. de Oliveira & Italo Suassuna

Resumo

Ocorrência de bactérias de origem fecal e cutâneo-mucosa em xícaras de café, como modelo experimental para a avaliação da presença de germes contaminantes em utensílios submetidos a aquecimento em locais públicos de alimentação. Em duas Regiões Administrativas do Rio de Janeiro, diversas em seus padrões sociais, econômicos e culturais, foram examinadas xícaras provenientes de 96 bares e restaurantes, no sentido de se determinar a presença de diversas espécies de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* e, entre *Streptococcus*, do grupo enterococo. No total, 78% dos bares foram positivos para os organismos em estudo, numa região, e 52%, na outra. Igualmente, a distribuição dos achados diferiu nas duas áreas. As amostras isoladas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* e enterococo mostraram termo-resistência comparável a 65°C e, ao lado das demais estirpes estudadas, adequaram-se ao objetivo da investigação. As técnicas utilizadas foram suficientemente simples e adaptáveis a métodos quantitativos. Finalmente, concluiu-se pela necessidade de obtenção de maiores informações sobre a distribuição da tribo *Klebsielleae* na microbiota, sendo questionável sua inclusão apenas como indicador de origem fecal.

Summary

Bacterial indicators of contamination from dishware exposed to heated baths in bars and restaurants

The presence of bacteria from fecal and mucous-cutaneous origin was investigated in demitasses for drinking coffee as an experimental model for evaluation of bacterial contamination in dishware, usually kept in hot or warm baths in public eating places. In two urban districts of Rio de Janeiro differing in their social, economical and cultural backgrounds, demitasses from 96 bars and restaurants were swabbed and the several species of *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus*, besides the enterococcus group, were investigated. In the overall 78 percent positive results for the searched organisms were found in one district and 52 percent in the other. The distribution of findings also varied in both areas. Isolated strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* and enterococcus showed comparable heat-resistance at 65°C, and with the other bacterial strains studied, they seem adequate for the purpose. The techniques for investigating their presence were sufficiently simples and easy to adapt to quantitative methods. Finally, it was concluded that additional data on the distribution of the *Klebsiella* and *Enterobacter* organisms are needed, and that the interpretation of their finding as sole indicator for a fecal origin is questionable.

Introdução

A possibilidade de transmissão de agentes infeciosos, através da contaminação de utensílios relacionados com a alimentação, é reconhecida nos textos de regulamentos e na legislação específica sobre o assunto^{7,19,20}, sendo consideradas como possibilidades principais como origem destes agentes, o trato aéreo superior, o revestimento cutâneo-mucoso e o meio intestinal^{11,12}.

É freqüentemente difícil, no entanto, dissociar a contaminação veiculada pelos alimentos, daquela devida à manipulação e falta de higiene adequada no cuidado com utensílios ou vasilhames, que melhor refletiriam os padrões sanitários dos próprios estabelecimentos dotados de serviços de alimentação.

As técnicas destinadas a avaliar o padrão de higiene de utensílios valem-se da revelação de microrganismos indicadores de contaminação fecal em água^{1,11,12} ou da investigação de patogênicos específicos.

* Trabalho do Serviço de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado da Guanabara, realizado com auxílio parcial do CNPq, protocolo 1724 e apresentado na GIAM IV — Quarta Conferência Internacional sobre os impactos Globais da Microbiologia Aplicada, São Paulo 23 — 28 de Julho de 1973.

** Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado da Guanabara.

cos^{3,8,11}. Quando os utensílios são submetidos ao aquecimento, introduz-se um fator de alteração dos padrões admitidos, na medida em que a resistência dos microrganismos à ação lesiva da temperatura é variável, podendo um germe indicador mostrar-se mais sensível do que agentes patogênicos importantes^{24,27}. A escolha, como indicadores, de organismos termodúricos⁹, os quais podem sobreviver a temperaturas letais para outros germes, seria de maior significação nesse sentido.

O hábito de se beber café em pequenas xícaras, amplamente difundido entre a população brasileira, particularmente nos centros urbanos, parece oferecer condições excepcionais para o estudo do problema, devido às seguintes características relacionadas com o alimento (bebida) ou com o recipiente em que é servido: a) o alimento apresenta-se provavelmente estéril, pela fervura, relativamente prolongada à que é submetido nos percoladores ou máquinas em que se prepara a infusão; b) exceto pela adição posterior de açúcar, o valor nutritivo do café, como bebida, é reduzido para entreter a multiplicação de microrganismos, sendo consumido em temperaturas ainda relativamente elevadas; c) a xícara é habitualmente submetida a lavagem manual e imersa em banho maria, em condições presumivelmente variáveis de tempo e de temperatura, de acordo com a demanda dos consumidores; d) a mesma xícara é usada numerosas vezes por dia, levada à boca de diferentes consumidores, e sendo manipulada apenas por estes e pelos empregados do estabelecimento.

Considerados como possíveis indicadores bacterianos para avaliação, foram escolhidos os germes coliformes, classicamente utilizados na determinação de índices de poluição fecal^{1,2} e os enterococos de igual significado²⁹, com a vantagem dos últimos terem sido propostos no sentido de se avaliar contaminação menos recente que a evidenciada pelos coliformes²⁴, e de admitir-se serem mais resistentes ao aquecimento que os germes Gram negativos entéricos¹⁴. Outrossim, foi investigada a presença das espécies de *Staphylococcus*, pela sua ocorrência predominante na pele e nas mucosas, destacadamente no couro cabeludo, narinas e trato aéreo superior, como revisto por Rosebury²⁹, Marples²⁶ e Klingman²⁵, sendo também destacada sua relativa termo-resistência³.

Material e Métodos

Área de estudo — A investigação foi feita em duas Regiões Administrativas da Cidade do Rio de Janeiro, correspondentes à IV (Botafogo) e à IX (Vila Isabel). Em Vila Isabel, uma lista de estabelecimentos destinados à alimentação pública, incluindo bares, cafés e restaurantes, foi obtida e utilizada segundo técnica sistemática de sorteio de amostras²², correspondendo a um entre cada oito estabelecimentos constantes da

lista, atingindo-se o total de 44. Em Botafogo, uma lista semelhante não pode ser obtida. A região foi consequentemente dividida em cinco zonas, de acordo com os pólos comerciais de maior importância. Em cada uma dessas zonas, foram examinados dez estabelecimentos, tomando-se em consideração sua melhor dispersão, como avaliada pela projeção do mapa da área considerada, atingindo-se assim a 50 bares ou cafés examinados.

Coleta dos espécimes — Em cada estabelecimento, foi utilizada uma xícara, solicitada por um dos autores, sendo passado um "swab" estéril, de algodão, no fundo, parede interna do recipiente, e borda superior interna, no horário entre 15 e 17 horas. O "swab" foi imediatamente colocado em 3 mililitros de caldo extrato de carne e levedura glicosado, preparado de acordo com Cowan & Steel¹³:

extrato de levedura	3,0 g;
extrato de carne	10,0 g;
peptona	10,0 g;
glicose	1,0 g;
cloreto de sódio	5,0 g;
água destilada, q.s.	1 000,0 ml.

Após incubação por 24 horas, o crescimento obtido foi analisado por semeadura em ágar-eosina-azul de metíleno (E.M.B. Ágar), para o isolamento de germes coliformes, e em ágar com 6,5% de cloreto de sódio, para o isolamento de estafilococos e enterococos^{10,24}, não se verificando, no último meio, o crescimento de germes Gram negativos, outros estreptococos e micrococos¹³.

O meio hiperclorotado, para isolamento de cocos Gram positivos, obedeceu à mesma composição do caldo extrato de carne e levedura glicosado, antes referido, com uma concentração de 6,5% de cloreto de sódio e a inclusão de 1% de ágar.

Identificação de microrganismos indicadores — Os enterococos foram reconhecidos por sua morfologia colonial e microscópica (coloração de Gram), resistência a 6,5% de cloreto de sódio e prova da catalase. Os estafilococos foram submetidos às mesmas provas e distinguidas as espécies pelos testes de coagulase (livre e ligada), fermentação de manitol e produção de pigmento^{4,23}.

A diferenciação de coliformes foi realizada de acordo com os métodos anteriormente descritos³¹, seguindo-se os esquemas propostos por Edwards & Ewing¹⁶.

Índice colimétrico — Foram realizados de acordo com os métodos da "American Public Health Association"², oficializados para o Brasil¹⁸.

Provas de resistência ao calor — Os germes testados foram cultivados em caldo nutritivo durante 24 horas. O crescimento de cocos Gram positivos foi uti-

lizado como tal, e o de bactérias Gram negativa padronizado para turvação equivalente ao número 2 da Escala de MacFarland. Um inóculo, correspondente a aproximadamente 3×10^6 células por mililitro, em 2 ml de solução salina isotônica, foi submetido ao aquecimento em banho maria, durante 10 minutos, a temperaturas entre 50 e 70°C, a intervalos de 5°C. Após o aquecimento, foi transferida uma alça da suspensão, para caldo glicosado, incubando-se a 37°C e observando-se o crescimento até 48 horas.

Resultados

As duas regiões administrativas estudadas correspondem a áreas urbanas que divergem em suas estruturas de ordem social, cultural e econômica, as quais, aparentemente, se relacionam a níveis mais elevados no bairro de Botafogo.

Os resultados globais do encontro de microrganismos indicadores pesquisados, estão expressos na Tabela 1, a qual demonstra percentagem mais elevada de achados para o bairro de Botafogo. Considerando, porém, a natureza dos germes encontrados, verifica-se de acordo com a Tabela 2, que os estafilococos foram duas vezes mais freqüentes em Botafogo que em Vila Isabel, o que ocorreu igualmente com os germes coliformes, ao contrário, nesse último caso, do outro indicador de poluição fecal, os enterococos, que foram quatro vezes mais freqüentes em Vila Isabel.

Em Botafogo, a maior freqüência de *Staphylococcus*, deveu-se a *Staph. epidermidis*, típico representante do revestimento cutâneo-mucosos^{25,26}, que foi três vezes mais freqüente que em Vila Isabel. O mesmo não ocorreu com *Staph. aureus*, cuja freqüência foi idêntica nas duas áreas e que, embora ubiquitário²⁵, tem seu nicho ecológico mais constante nas fossas nasais²⁶.

Considerando a diferenciação de germes coliformes, de acordo com a Tabela 4 verifica-se que sua maior freqüência em Botafogo deveu-se essencialmente a espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*, quase três vezes mais freqüentes naquela região administrativa, ao contrário de *Escherichia coli*, que foi quatro vezes mais freqüente em Vila Isabel, o que coincide com o encontro de enterococos, também de maior freqüência em Vila Isabel (Tabela 2).

Voltando às espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*, cuja distribuição revela-se equivalente no bairro de Botafogo (Tabela 5) para *Klebsiella pneumoniae* e as espécies de *Enterobacter*, pode ser dito que, embora tenha sido assinalada, com certa freqüência, na pele e no trato respiratório^{26,32}, sua distribuição e identificação, no revestimento cutâneo-mucoso do homem, é ainda largamente ignorada. A freqüência relativa das espécies de *Enterobacter*, discriminadas na Tabela 5, corresponde, outrossim, à sua distri-

Tabela 1

Freqüência de isolamentos de bactérias indicadoras de contaminação em xícaras de café em duas regiões administrativas da cidade do Rio de Janeiro.

Região administrativa	Número de bares examinados	Resultados positivos
Botafogo	50	39 (78%)
Vila Isabel	44	23 (52%)
TOTAL	94	62 (66%)

Tabela 2

Distribuição dos resultados positivos de acordo com o grupo de bactérias indicadoras de contaminação.

Microrganismos isolados	Região administrativa Botafogo	Região administrativa Vila Isabel	Total de bares positivos
Coliformes	23 (46%)	10 (23%)	33 (35%)
Enterococos	4 (8%)	16 (36%)	20 (21%)
Estafilococos	25 (50%)	12 (27%)	37 (39%)

Tabela 3

Identificação das espécies de *Staphylococcus* encontrados como contaminantes em xícaras de café.

Identificação	Região administrativa Botafogo	Região administrativa Vila Isabel	Total de bares positivos
<i>Staph. epidermidis</i>	21 (42%)	6 (14%)	27 (29%)
<i>Staph. aureus</i>	8 (16%)	7 (16%)	15 (15%)

Tabela 4

Identificação dos germes coliformes encontrados como contaminantes em xícaras de café

Identificação	Região administrativa Botafogo	Região administrativa Vila Isabel	Total de bares positivos
<i>Escherichia coli</i>	1 (2%)	4 (9%)	5 (5%)
<i>Klebsiella</i> — <i>Enterobacter</i>	23 (46%)	7 (16%)	30 (32%)
<i>Citrobacter freundii</i>	0	1 (2%)	1 (1%)

Tabela 5

Especies de coliformes da tribo *Klebsielleae* isolados como contaminantes de xícaras de café na região administrativa de Botafogo

Espécies	Freqüência em relação a Estirpes isoladas	Bares positivos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14 (47%)	12 (67%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	13 (43%)	11 (61%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2 (7%)	2 (11%)
<i>Enterobacter liquefasciens</i>	1 (3%)	1 (6%)
TOTAIS	30 (100%)	18 (100%)

buição relativa em materiais das mais variadas origens¹⁷.

Como comentado na introdução, a exposição das xícaras a um banho de água aquecida, antes de serem utilizadas, poderia condicionar a seleção de uma ou outra espécie entre as bactérias investigadas, dada a admissível variabilidade de resistência ao tempo e temperaturas utilizados, em si mesmos submetidos a muitas flutuações nas condições de uso. A Tabela 6 mostra a termo-resistência de uma parte das estirpes isoladas, aparecendo *Staph. aureus*, provavelmente, como a espécie dotada de maior resistência nesse particular e *Enterobacter sp.* e *Staph. epidermidis* como, aparentemente, as mais sensíveis, embora de encontro relativamente freqüente. Todavia, ao nível de 65°C, não houve diferença essencial entre *Staph. aureus*, enterococos e *Klebsiella sp.* o que, com certa probabilidade, não justifica as diferenças de distribuição entre esses grupos bacterianos. Curiosamente, não se pode salientar, em termos comparativos, os enterococos isolados como particularmente termo-resistentes.

Afinal, tendo em conta as diferenças de distribuição entre os microrganismos indicadores pesquisados, a Tabela 7 mostra que raramente houve associação entre *Klebsiella* e *Enterobacter* e os enterococos, parecendo mais provável a associação destes últimos com *Escherichia*, sendo a conclusão prejudicada pela pequena freqüência com que *Escherichia* foi encontrada.

Em 10 oportunidades, a água de abastecimento dos estabelecimentos estudados, em Botafogo, foi diretamente colhida das torneiras e investigada a presença de germes coliformes, sendo os resultados negativos em todos os casos.

Discussão

Os achados de enterococos e *Escherichia coli* parecem harmonizar-se. A natureza termodúrica dos enterococos é freqüentemente apontada^{9,15}. Belui et col.⁵, testando grande número de estirpes de enterococos, obtiveram multiplicação da quase totalidade a 50°C e comprovaram sua resistência à temperatura de 60°C durante 30 minutos. Para *Escherichia coli*, Carpenter⁹ indica a temperatura de 47°C como limite para sobrevivência. No entanto, Suassuna & Suassuna³⁰ mostraram que, de 18 amostras de *Escherichia coli*, apenas uma deixou de crescer a 45°C. A menor resistência dessa espécie é, entretanto, admissível. Aponta-se que, como contaminantes de águas, os enterococos persistem por maior tempo que *Escherichia coli*²⁴ e, igualmente, tem sido observada sua maior resistência ao cloro, em águas de piscinas²⁸, estando, esse desinfectante, obviamente presente na água de abastecimento urbano. Tais da-

Tabela 6

Termo-resistência de microrganismos indicadores isolados

Grupo bacteriano	Sobrevivência após 10 minutos de exposição em solução salina					
		50C	55C	60C	65C	70C
<i>S. epidermidis</i>	Nº %	25 (100)	25 (100)	23 (92)	15 (60)	5 (20)
<i>S. aureus</i>	Nº %	8 (100)	8 (100)	8 (100)	7 (89)	4 (50)
<i>Enterococcus</i>	Nº %	6 (100)	6 (100)	6 (100)	4 (75)	3 (50)
<i>Klebsiella</i>	Nº %	14 (100)	14 (100)	14 (100)	13 (93)	8 (57)
<i>Enterobacter</i>	Nº %	16 (100)	16 (100)	16 (100)	14 (88)	2 (13)
<i>E. coli</i>	Nº %	1 —	1 —	1 —	1 —	0 —

Tabela 7

Freqüência e associação de bactérias indicadoras de origem fecal

Grupos encontrados	Região administrativa		Total
	Botafogo	Vila Isabel	
<i>E. coli</i> , apenas	1	2	3
<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	—	2	2
<i>Klebsiella</i> - <i>Enterobacter</i> , apenas	22	5	27
<i>Klebsiella</i> - <i>Enterobacter</i> + <i>Enterococcus</i>	1	2	3
<i>Enterococcus</i> , apenas	3	12	15

Klebsiella - *Enterococcus* = *Klebsiella* e ou/*Enterococcus*

dos parecem justificar o isolamento, quatro vezes maior, de enterococos que de *Escherichia coli*.

Confirma-se ainda a termo-resistência de *Staphylococcus*, característica particularmente acentuada em *Staph. aureus*, cujo limite de sobrevivência foi assinalado variar em uma faixa entre 55 e 70°C³.

Menos clara é a justificativa da ocorrência de *Klebsiella* e *Enterobacter* (Tribo *Klebsielleae*) em Botafogo, onde foi menos freqüente a verificação de enterococos e *Escherichia coli*, e maior o encontro de *Staph. epidermidis*, de provável origem cutânea. Esses dados permitem algumas hipóteses para a sua justificação. Uma consideração inicial admitiria que a tribo *Klebsielleae* divergisse dos outros grupos pesquisados quanto à sua resistência ao calor. Isto parece afastado pelos dados apresentados sobre a termo-resistência comparativa das estirpes isoladas. Também foi excluída sua presença como contaminante original da água de abastecimento, nos estabelecimentos investigados.

Uma segunda hipótese admite que o crescimento prévio em caldo, como processo de enriquecimento,

tenha estimulado, seletivamente, o crescimento de *Klebsielleae*, em detrimento de outras espécies. Seria necessário justificar, nesse caso, sua ausência na região administrativa de Vila Isabel. Todavia, Hajna & Perry²¹ referem-se ao antagonismo existente entre *Escherichia* e enterococos em culturas mistas, sendo dominante o Gram negativo, abrindo a possibilidade de que o mesmo possa ocorrer entre *Klebsielleae* e enterococos. Blank⁶, no entanto, aponta evidências na literatura que admite o antagonismo inverso de germes Gram positivos sobre germes Gram negativos em regiões úmidas da pele. Os presentes dados não permitem esclarecimentos adicionais.

Como terceira hipótese admissível é que a presença de *Klebsielleae* não seja apenas a expressão de contaminação fecal, o que se harmonizaria com a freqüência relativa dos outros indicadores nas duas áreas estudadas. Revendo a literatura, Rosebury²⁹ assinala uma freqüência de 4,2% de *Escherichia coli* e de 52% de *Klebsiella aerogenes* na boca e saliva. Shehadeh & Klingman³² referem 22% de isolamento de *Aerobacter* a partir da axila. Finalmente, uma

definida predominância de estirpes isoladas da boca, ouvido, cavidade nasal, escarro e outras secreções e exsudatos respiratórios encontra-se nas 1 758 amostras de *Klebsielleae* estudadas por Fife, Ewing & Davies¹⁷, exceto para *Enterobacter alvei* (*E. hafniae*) não encontrada no presente estudo. As amostras de origem fecal correspondem a menos de 10% nas investigações daqueles autores, embora não se possa excluir uma certa seletividade do conjunto.

Em conclusão, admite-se: a) que os microrganismos indicadores utilizados parecem adequados ao propósito visado; b) que a técnica utilizada é suficientemente simples e pode ser facilmente adaptada a investigações quantitativas, mais adequadas à avaliação das condições higiênicas dos utensílios, na independência da contaminação veiculada pelos próprios alimentos; c) que estudos ecológicos concernentes, sobretudo à distribuição da tribo *Klebsielleae* na microbiota humana, são necessários para esclarecer a sua origem, sendo provavelmente questionável, nesse sentido, sua inclusão, unicamente, como indicador de contaminação fecal.

Referências Bibliográficas

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Subcommittee on Food Utensil Sanitation — A proposed method for control of food utensil sanitation. *Am. J. Pub. Hlth.*, 34:255-258, 1944.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of water and wastewater. 12nd. ed., New York, Apha, 1965.
- ANGELOTTI, R.; WILSON, E.; FOTER, M.J. & LEWIS, K.H. — Time-temperature effects on Salmonellae and Staphylococci in foods. I. Behavior in broth cultures and refrigerated foods. Cincinnati, Department of Health, Education, and Welfare, Technical Report, F 59-62, 1959.
- BAILEY, W.R. & SCOTT, E.G. — Diagnostic Microbiology. 3rd. ed., C.V. Mosby Co., St. Louis, 1970. 385 p.
- BELQUI, I.; CAFFÉ, I. & PLECEAS, P. — Contribution à l'étude de la classification des streptocoques group D. I. Détermination de group et d'espèce des entérococques. *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 23:345-353, 1964.
- BLANK, I.H. — Survival of bacteria on the skin p 43-47 In Maibach, H.I. & Hildrick-Smith, G. (Ed.) — Skin bacteria and their role in infection. McGraw-Hill Book Co., N. York, Sydney, Toronto, London, 1965. 331 p.
- BRASIL — Leis, decretos etc. Decreto 986. Normas básicas sobre alimentos. D.O., 21 out. 1969.
- CANDEIAS, J.A.N.; CHRISTOVÃO, D.A. & COTILHO Z., L.G. — Isolamento de vírus de copos de bares e cafés da cidade de São Paulo. *Rev. S. Publ.*, 2:174-179, 1968.
- CARPENTER, P.L. — Microbiology. 2nd. ed., Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1967.
- CHAPMAN, G.H. — The significance of sodium chloride in studies of Staphylococci. *J. Bact.*, 50:201-203, 1945.
- CHRISTOVÃO, D.A. — O problema sanitário dos copos, louças e talheres dos restaurantes, bares e cafés do centro da cidade de São Paulo, revelado por inquérito bacteriológico. Causas determinantes e sugestões para a sua solução. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 1:241-264, 1947.
- CHRISTOVÃO, D.A. — As condições sanitárias dos copos, louças e talheres de restaurantes, bares e cafés do centro da cidade de São Paulo. 2º inquérito bacteriológico. *Rev. paul. Med.*, 49:385-403, 1965.
- COWAN, S.T. & STEEL, K.J. — Manual for the identification of medical bacteria. London, Cambridge University Press, 1965.
- DUBOS, R.J. — Bacterial and mycotic infections of man. 2nd. ed., Philadelphia, J.B. Lippincott Co., 1952.
- DUPIÉ, M.V. & FROBISHER, M. — Thermal Death: Rickettsia and Bacteria Part I Animal Pathogens p 103-107 In Altman, P.L. & Dittmer, D.S. (Ed.) — Environmental Biology. Its. ed., Bethesda, Federation of American Societies for Experimental Biology, 1966.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed., Minneapolis, Burgess Publ. Co., 1972. 362 p.
- FIFE, M.A.; EWING, W.H. & DAVIS, B.R. — The biochemical reactions of the tribe *Klebsielleae*. U.S. D/H.E.W. Communicable Disease Center, Atlanta, 1965. 43 p.
- GUANABARA — Leis, decretos etc. Decreto 572. Índice colí em água. D.O., 29 mar. 1966.
- GUANABARA (ex-Distrito Federal) — Leis, decretos etc. Decreto 9761. Regulamento sanitário. D.O., 21 maio 1949.

20. GUANABARA — Leis, decretos etc. Lei nº 1.043. Código de Saúde do Estado da Guanabara. D.O., 4 ago. 1966.
21. HAJNA, A.A. & PERRY, C.A. — Comparative study of presumptive and confirmative media for bacteria of the coliform group and for fecal Streptococci. *Am. J. Pub. Hlth.*, 33:550-556, 1943.
22. HILL, A.B. — Princípios de estatística médica, 3a. ed., Buenos Aires, El Ateneo, 1965.
23. IVLER, D. — *Staphylococcus*. p 61-64 In Blair, J.E.; Lennette, E.H. & Truant, J.B. (Ed.) — Manual of Clinical Microbiology. Bethesda, 1970. 727 p.
24. KJELLANDER, J. — Enteric Streptococci as indicators of fecal contamination of water. *Acta path. microbiol. scand.* 48 (supl. 136):1-124, 1960.
25. KLIGMAN, A.M. — The bacteriology of normal skin. p 13-31. In Maibach, H.I. & Smith, G.H. — Skin bacteria and their role in infection. McGraw-Hill Book Co., N. York, Sydney, Toronto, London, 1965. 331 p.
26. MARPLES, M.J. — The ecology of the human skin. Charles C. Thonnes, Springfield, Illinois, 1965. 970 p.
27. MERCK, DARMSTADT — Examen bacteriológico de águas. Diagnostica Merck, Merck Darmstadt, 1972.
28. MULLER, G. — Bacterial examination of chlorinated water. *Arch. Hyg.*, 151:402-409, 1967.
29. ROSEBURY, T. — Microorganisms indigenous to man. 1st. ed., Philadelphia, McGraw-Hill, 1962.
30. SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I.R. — The indole reactions of *Enterobacteriaceae*. II. Cultural condicions affecting indole production. *An. Microbiol. (Rio)*, 10:123-145, 1962.
31. SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I.R. — Enterobactérias: diferenciação bioquímica. Métodos para diagnóstico de Enterobactérias. *Rev. bras. Patol. Clin.*, 5:8-18, 1969.
32. WILLIAMS, R.E.O. — Pathogenic bacteria on the skin. p 49-60. In Maibach, H.I. & Hildick-Smith, G. (Ed.) — Skin bacteria and their role in infection. McGraw-Hill, N. York, Sydney, Toronto, London, 1965. 331 p.

Distribuição de fatores de resistência entre culturas de *Escherichia coli* isoladas do ceco de bovinos

Mabel Hanna Vance* & Marcelo Magalhães**

Resumo

De 166 culturas de *Escherichia coli* isoladas do ceco de bovinos, apenas 4 apresentaram-se resistentes a droga e destas, 2 foram capazes de auto-transferência. Por outro lado, de 162 amostras suscetíveis, 10 (6,2%) transportavam FTRs.

Summary

Distribution of resistance factors among Escherichia coli from bovines

Out of 166 cultures of *Escherichia coli* recovered from the caecum of bovines, only four showed drug-resistance. Among these, two were able of self-transfer. Of the 162 susceptible strains, 10 (6.2%) carried RTFs.

O emprego abusivo de antibióticos, na profilaxia e tratamento de infecções veterinárias, vem proporcionando uma progressiva seleção de fatores de resistência (fatores R) entre as enterobactérias de animais. Esses microrganismos, atingindo o trato digestivo humano, eventualmente transferem seus fatores R às bactérias residentes, contribuindo, desse modo, para o agravamento do problema da resistência a drogas, em medicina humana (Anderson, E.S., *Ann. Rev. Microbiol.* 22:131-180, 1968).

Neste trabalho, é reportada a distribuição de fatores R e de fatores de transferência de resistência (FTR) entre linhagens de *Escherichia coli*, isoladas do ceco de bovinos, com o intuito de avaliar suas potencialidades como fonte de fatores R, na cidade de Recife, Pe.

Cento e sessenta e seis culturas de *E. coli*, isoladas do ceco de bovinos, abatidos no Matadouro Municipal de Recife, foram submetidas ao antibiograma pelo método das diluições em meio sólido. As culturas resistentes foram cruzadas com a *E. coli* K12R^f com o propósito de verificar a transferibilidade de sua resistência. Por outro lado, nas culturas suscetíveis, pesquisou-se a presença de FTR pela técnica dos cruzamentos tríplices que envolve, como

doadora-receptora intermediária, a amostra de *E. coli* K12SSu, portadora de resistência plasmidial, não auto-transferível, à estreptomicina e sulfas (Anderson, E.S. & Lewis, M. J., *Nature (London)* 208:843-849, 1965).

Das 166 culturas examinadas, apenas quatro (2,4%) apresentaram-se resistentes: uma à tetraciclina, uma à estreptomicina e sulfa e as duas restantes à furazolidona. As duas primeiras culturas transferiram seus determinantes de resistência para *E. coli* K12, enquanto a resistência à furazolidona não foi passível de mobilização. Por outro lado, das 162 culturas suscetíveis, 10 (6,2%) transportavam FTR, isto é, foram capazes de mobilizar os determinantes SSu de *E. coli* K12SSu^r para *E. coli* K12Rif^r. As características dos FTR isolados são mostradas na Tabela 1.

Os resultados obtidos mostram que a freqüência de linhagens resistentes de *E. coli* é extremamente baixa nos bovinos de corte de Recife. Conseqüentemente, é improvável sua participação como fonte de determinantes de resistência para as enterobactérias do homem, nessa cidade. Isso, certamente, se deve ao fato de que os rebanhos destinados ao abate são mestiços zebuíños, criados em regime extensivo, sem

* Bolsista do CNPq.

** Microbiologia. Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Caixa Postal 2071, 50.000 Recife, PE.

qualquer assistência veterinária e uso terapêutico ou profilático de antibióticos. Provavelmente, a diferença de regimes de criação e uso de drogas explicaria o elevado índice de resistência encontrado entre culturas de *E. coli* em bovinos de São Paulo (Moreno, G., Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32:63-68, 1972).

Por outro lado, uma fração razoável das culturas susceptíveis transportam FTR, o que possibilitará a transferência de resistências, eventualmente selecionadas, pelo emprego abusivo de drogas antimicrobianas.

Tabela 1

Características de FTRs isolados de *E. coli* de bovinos

Nº de FTRs	Restrição do Fago μ^2 na K12F ⁻	Restrição do Fago μ^2 na K12Hfr H	Inibição da Fertilidade
4	-	-	Fi ⁻
3	-	+	Fi ⁺
2	+	+	Fi ⁺
1	+	-	Fi ⁻

Modificação do ágar verde brilhante modificado para o isolamento de salmonelas fermentadoras de lactose

Marcelo Magalhães * & Adélma Véras*

Resumo

A substituição da lactose pela rafinose, no agar verde brilhante, foi feita com o objetivo de facilitar a detecção de variantes lactose-positivas de *Salmonella*.

Summary

Modification of brilliant green agar for detecting lactose-positive salmonellae.

The replacement of lactose by raffinose in brilliant green agar was done to avoid missing lactose-positive variants of *Salmonella*.

Introdução

Recentemente, observou-se que 52,1% das culturas de *Salmonella typhimurium*, isoladas em São Paulo, atacavam rapidamente a lactose nos meios clássicos de isolamento (Pessôa, G.V.A. — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33:13-28, 1973). Essas culturas somente não passaram desapercebidas devido ao emprego sistemático de um meio de identificação presuntiva desprovidos daquele carboidrato (Rugai, E. & Araújo, A. — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:79-83, 1968). A natureza plasmidial do fator Lac foi demonstrada e verificou-se, adicionalmente, que 10% das amostras de *S. oranienburg*, isoladas naquela cidade, também fermentavam a lactose (Le Minor, L. & col. — *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 125A:261-285, 1974). Esses fatos mostram a necessidade de eliminar a lactose dos meios seletivos preconizados para o isolamento de salmonellas. No presente trabalho, avalia-se a substituição daquele dissacarídeo pela rafinose, no agar verde brilhante, com o propósito de superar as dificuldades inerentes ao isolamento de espécies ou de variantes lactose-positivas, pertencentes ao gênero *Salmonella*, em meios seletivos lactosados.

No preparo do meio utilizou-se, como base, o ágar soja tripticase (Tryptic soy agar, Difco) ao qual se adicionou, para 1000ml, sacarose 10g, rafinose 10g, verde brilhante 0,0125g e vermelho fenol 0,08g. Não

houve necessidade de ajustamento do pH.

Cinco culturas de *S. typhimurium* lactose-positivas, isoladas em São Paulo e cedidas pelo Dr. Gil Pessôa, foram usadas para contaminação artificial de amostras fecais, com a finalidade de simular as condições rotineiras de isolamento de enterobactérias. Avaliou-se, ainda, o desempenho do meio modificado, com referência à exclusão de *Citrobacter*, comparando-o com a fórmula lactosada, frente a 300 coprocultivos.

Todos os espécimes, contaminados artificialmente, forneceram colônias típicas do gênero *Salmonella* no meio modificado. Isso não ocorreu no meio original, onde aquelas colônias foram indistinguíveis das de outros organismos fermentadores rápidos da lactose. Por outro lado, como seria de esperar, desde que o número de amostras de *Citrobacter* fermentadoras da lactose foi superior aquele que ataca a rafinose, o meio original mostrou-se mais eficiente para a eliminação desse microorganismo (Tabela 1). Entretanto, essa desvantagem foi largamente recompensada pelo fácil reconhecimento das colônias suspeitas de salmonelas, fermentadoras ou não da lactose, no meio modificado. A impossibilidade de distinguir, com segurança, as colônias lactose-positivas de *Salmonella*, no meio clássico, obrigava a repicagem sistemática de grande número de colônias, para os meios de identificação presuntiva, ao pretender-se evitar os falsos resultados negativos no diagnóstico bacteriológico das gastrenterites.

* Disciplina de Microbiologia, Faculdade de Medicina, Cidade Universitária, 50000 Recife, Brasil.

Tabela 1

Comparação entre os meios ágar verde brilhante contendo lactose ou rafinose no isolamento de *Salmonella* de 305 espécimes fecais enriquecidos em tetracionato.

Verde brilhante	Placas suspeitas	Salmon. lac ⁺	Salmon. lac ⁻	Citrob.	Proteus	Pseudom.
Lactose	31	0	14	5	1	11
Rafinose	43	5*	14	12	1	11

* 5 culturas de *S. typhimurium* lac + adicionados artificialmente.

The bacteriology of fruit juices

J. G. Carr*

Summary

The bacteria able to proliferate in fruit juices are restricted to a few groups of acid-tolerant ones that are to be found in the following genera: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, *Acetomonas* and *Zymomonas*. Apart from these major groups, there are others, less acid tolerant, that appear in juices of higher pH. These bacteria are described herein together with methods for their isolation, identification and prevention in the processing plants and finished products.

Resumo

Bacteriologia de sucos de fruta

Descrição das bactérias capazes de proliferar em sucos de fruta e dos métodos de isolamento, identificação e da prevenção nas usinas de processamento e acabamento de produtos. As bactérias do grupo estão restritas a poucos ácido-tolerantes e podem ser encontradas nos seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, *Acetomonas* e *Zymomonas*. Além dos principais grupos citados, há outros, menos ácido-tolerantes, que aparecem em sucos de pH mais elevado. O problema assume aspectos relevantes, considerando-se o aumento de consumo de sucos vegetais em todo o mundo e o vasto potencial do Brasil para atividades industriais e agrícolas para consumo interno ou para exportação. A bacteriologia de sucos vegetais é aspecto importante da tecnologia industrial que envolve operações de extração, manipulação e armazenamento de frutas.

Introduction

In the Americas and Western Europe the habit of consuming fruit juices is growing, first because they are pleasant and refreshing, secondly because they provide a source of ascorbic acid, and thirdly because in some European countries, notably Switzerland and Germany, their production has been encouraged to counter the making of fermented beverages. In a country such as Brazil, with its vast potential for industrial and agricultural activities, it is inevitable that increasing areas of land will be devoted to fruit growing and this in turn leads to processing and exporting of a variety of fruit juices. Such operations as extracting, handling and storing fruit juices lead to a number of technological problems, not the least of which are microbiological in nature. Perhaps the most common microbiological change for a juice to undergo is that of alcoholic fermentation and because of the ubiquity of yeasts prevention of their growth is a major problem. It is, however, intended to deal with these micro-organisms in a separate paper.

Bacteria found in fruit juices are restricted to

those that are tolerant of high acid conditions. Since most fruit juices fall between pH 3.0 - 4.0 it can be seen that only the most acid tolerant may be found in this situation. This is fortunate for the consumer for if a bacterium pathogenic to humans were inadvertently to get into a fruit juice its life would be short and its chances of causing disease very remote indeed. There are perhaps a couple of exceptions to this, namely, pear and tomato juice, which will be mentioned later.

The processor is perhaps somewhat less fortunate than the consumer for it is those bacteria able to cause adverse changes in appearance, flavour, aroma and texture of the juices that will cause problems which could lead to severe financial losses. The bacteria most likely to be found in such conditions of disorder belong to the following genera: *Acetobacter*, *Acetomonas* (*Gluconobacter*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Zymomonas*. It is the intention of this review to discuss the activities of these bacteria in relation to some of the fruit juices in which they grow and to see what methods may be applied to prevent their growth.

* University of Bristol, Research Station, Long Ashton, Bristol, England

Fruit Handling and Processing

Harvesting — There are two ways of harvesting fruit, either by manual labour or by machines. In countries where plantations or orchards tend to be small and where cheap labour is readily available, hand harvesting is usual. In those countries where industry competes strongly for workers, hand harvesting becomes uneconomic and machines are devised to remove fruit from the trees or bushes on which they grow. Generally the mechanical harvesters have some means of shaking the trees, a frame in which to catch the falling fruit and a conveyor to pass it on to the waiting trucks for transportation to the factory. Some harvesters remove the fruit from the trees, which is in turn picked up by another device. Such a practice is used in gathering apples for the extraction of juices for cider making in Britain. Sometimes the trees are shaken manually and allowed to shed their apples on to the ground.

Whatever method of harvesting is used it is inevitable that some damage to the fruit takes place. Some forms of mechanical harvesting damage the fruit to such an extent that acid tolerant bacteria may increase 100-fold over a three weeks' period of storage. In those methods that allow the fruit to fall to the ground the risk of soil contamination and the subsequent acquisition of undesirable micro-organisms is very high indeed. Even if the method of harvesting does not involve the fruit falling to the ground it is possible that micro-organisms are present on the fruit. This is certainly true of grapes for Davenport¹⁶ has reported isolating yeasts and acetic acid bacteria from these fruits. Carr⁶ showed that, although rare, acid tolerant bacteria could be found on apples as they hung on the trees in the orchard.

Thus, any method of harvesting that encourages the increase of microbial population will tend to reduce the quality of juice subsequently extracted and sometimes the quantity as well. In bad infections the fruit can become soft and considerable losses of juice occur before extraction.

Processing — When the fruit reaches the factory there may be a period of enforced storage if there is a significant delay between fruit processing and delivery at the factory. It is during this time that micro-organisms grow as described in the previous section.

Juice extraction varies with the individual fruit. Oranges, for example, have to be treated as individuals because of the toughness of their skins. It is necessary to cut them in half or bore holes in them to extract the juice. Because of their skins they are fairly well protected against most microbial growth and it is only when the juice is released that there is a danger of picking up undesirable micro-organisms should the plant be improperly cleaned.

Fruit such as grapes and apples have only thin skins and are, therefore, vulnerable to damage at any time after harvesting. Indeed, pockets of damaged fruit may harbour undesirable microbes which are uniformly distributed through the juices when they are crushed and pressed. There is another category of fruit exemplified by the black currant (*Ribes nigrum*). Although they resemble the grape in having a thin skin and a watery soft interior, these fruits are very pectinous and if crushed before treatment release only a small amount of available juice. It is necessary to treat such fruits with depectinising enzyme before juice extraction. During the application of the enzyme the temperature is raised and this can produce conditions for the proliferation of unwanted micro-organisms.

The stage immediately after extraction is storage and this is when the juice is most vulnerable to infection. There are a number of ways of preventing microbial growth which will be discussed later, but it is first essential to consider the types of bacteria that can grow in juices and the chemical changes they can cause.

Type of organisms found in fruit juices — It has already been mentioned that the majority of fruit juices are sufficiently acid to prevent bacterial growth. This virtually limits the bacteria to two major groups and one or two other rather specialized species. The two major groups are the aerobic acetic acid bacteria and the microaerophilic lactic acid bacteria. In addition there is a small genus called *Zymomonas* which contains fermentative bacteria. There are several miscellaneous strains that will be described later.

Lactic Acid Bacteria

The activities of lactic acid bacteria — Table 1 shows the Gram positive bacteria, all of which belong to the Lactobacteriaceae. Within this family are two groups called the heterofermenters and the homofermenters, which differ in their biochemistry. The first of these is characterized by producing a mixture of end products from the metabolism of glucose which not only includes lactic acid but acetic acid, ethyl alcohol and CO₂. The homofermenters, in contrast, produce only lactic acid from the metabolism of glucose. These two metabolic pathways have been described in more detail by Carr⁷.

The cocci are divided into the genus *Leuconostoc* which are heterofermentative and the homofermentative tetrad-forming genus *Pediococcus*. Other genera exist within this family but species of these have not so far been found in fruit juices.

Table 1

Activities of the Gram-positive bacteria of juices

Type of organism	Chemical activity	Effect on juice
Homofermentative <i>Lactobacillus</i> spp.	Conversion of hexoses and pentoses to lactic acid. Conversion of malic acid to lactic acid. (This applies to nearly all lactic acid bacteria).	Production of excess acidity and destruction of sugars. Production of lactic acid and CO ₂ with a drop in acidity.
Some strains only	Conversion of citric acid to acetic acid. CO ₂ , acetoin and diacetyl.	Production of an off-flavour due to the presence of acetic acid and diacetyl.
Heterofermentative <i>Lactobacillus</i> spp.	Conversion of hexoses and pentoses to lactic acid, acetic acid, ethanol, CO ₂ . When fructose is the substrate, mannitol is produced in addition to the other end products.	Production of excess acidity and destruction of sugars. More rarely the production of an off-flavour called mousiness.
Some strains only	As well as the activities above, the production of polysaccharides from available sugars.	This imparts a slimy character to the juice.
Homofermentative <i>Pediococcus</i> spp.	Conversion of hexoses and pentoses to lactic acid, conversion of sugars to polysaccharides.	Production of excess acidity. This imparts a slimy character to the juice.
Heterofermentative <i>Leuconostoc</i> spp.	Activity towards hexoses and pentoses the same as for the heterofermentative <i>Lactobacillus</i> spp. Conversion of citric acid to lactic acid.	As for the heterofermentative <i>Lactobacillus</i> spp. Production of an off-flavour due to the presence of acetic acid and diacetyl.
Some strains only	Conversion of sucrose to dextran	Imparts a slimy consistency to the juice.

Methods for isolating lactic acid bacteria from juices — As these organisms are microaerophilic it is desirable to isolate them in an atmosphere of restricted oxygen. The easiest way of achieving this is to grow them in a jar that can be evacuated. There are refinements that can be applied, such as the partial replacement of the evacuated air with carbon dioxide or the addition of a moistened mixture of pyrogallic acid and sodium carbonate to remove the last traces of oxygen.

The temperature of incubation is preferable at a level of 25°C which is something of a compromise since the rods grow best at 30°C while the cocci are favoured by a temperature of about 22°C. Many of these organisms are slow growing and can take a week, or even longer, before visible colonies can be seen.

The medium for isolation can be varied according to the juice in which the organisms are growing. Very often the juice fortified with about 1% of yeast extract forms a very suitable growth medium. If the pH is low it is advisable to bring it up to between 4.5 and 5.0 because, although these bacteria are acid tolerant, they usually grow better at a higher pH.

Perhaps the medium most widely recommended for the growth of lactic acid bacteria is M.R.S. It should be remembered, however, that many lactic acid bacteria from juices will not grow in the medium as formulated by its inventors, de Man & col.²⁵. It should be lowered in pH to about 5.0 to be certain of supporting organisms from acid environments. Acid medium requires a higher concentration of agar to prevent hydrolysis of the gel and 3% is recommended. Reduction of the pressure and time of autoclaving also reduces the chance of destroying the agar gel structure. Instead of the usual 1.06 kg/sq. cm. for 15 minutes, autoclaving may be reduced to 0.7 kg/sq. cm. for 10 minutes. There is little risk of not obtaining proper sterilization because of the medium's low pH.

Media and methods for identifying lactic acid bacteria — These bacteria are extremely ubiquitous, occurring in habitats as widely dispersed as milk and milk products, meat and meat products, fermenting vegetables (olives, cucumbers, sauerkraut), the mouth, the vagina, beer, wine, cider and unfermented fruit juices to mention only the most important sources.¹⁰

Unfortunately much of the early work on these organisms was concerned with those from milk whilst the others, with a few exceptions, were somewhat neglected. The consequence of this is that much of the identification of the non-milk lactic acid bacteria is done in terms of the milk organisms. This is not easy since many of the media devised for milk bacteria are unsuitable for those from other habitats since one of the key factors is pH. As an example Fornachon & col.¹⁷ showed that certain heterofermentative lactobacilli from acid habitats fermented very few sugars at pH 7 whereas the number fermented by these organisms increased considerably when the pH was lowered. It is, therefore, essential to have all media used for the identification of these organisms from fruit juices at a pH below 5. Indeed, there are some bacteria that have become completely adapted to acidic habitats and grow slightly, if at all, at pH 7.0. For those from pear and tomato juice a pH of about 5 would be useful since these juices are somewhat less acid than those from other fruit.

There are many complex techniques that can be applied to the identification of lactic acid bacteria which are useful, mainly to taxonomists, e.g. G + C% ratios,²¹ cell wall constituents,³⁵ but to the routine bacteriologist working in a fruit juice processors, the minutiae of taxonomy is not required. It is, therefore, recommended that the following tests be used. Determination of the shape by Gram stain and microscopic examination. This enables the division into rods (*Lactobacillus* spp.) cocci (*Leuconostoc* or *Pediococcus* spp.). Production of gas from glucose which distinguishes between homo- and heterofermentative rods and distinguishes the heterofermentative *Leuconostoc* spp. from the homofermentative *Pediococcus* spp. If more information is required then the ability to ferment sugars and related compounds would further the identification of these organisms. The ability to ferment organic acids such as malic and citric acid, although not assisting particularly well in the organisms' identification, does give information on their potential activity in fruit juices. Other tests which help in establishing an isolate's potential behaviour in its habitats are heat tolerance, tolerance of ethyl alcohol and the minimum pH at which the organism will grow. All these tests have been described in detail by Carr.⁹

There are some characteristics of lactobacilli that may lead the inexperienced worker to ascribe them to other groups. One example is that the rods tend to lose their ability to hold Gram stain when old and might be regarded as Gram negative. Some lactic rods are motile but this is a fairly rare phenomenon. Others give the appearance of being catalase positive. An example of such an organism is *L. mali*¹² which, if hydrogen peroxide is applied to colonies growing on a neutral medium, gives rise to a very weak evolution

of gas. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology² *L. mali* is described as being catalase negative. While this statement may be true it does not alter the fact that gas is evolved when H₂O₂ is applied to the colonies and, therefore, gives the appearance of the occurrence of catalase.

The kinds of lactic acid bacteria found in fruit juices fall into two distinct categories. There are those which bear a certain resemblance to the species described in the literature. An example of this type is *Lactobacillus plantarum* which was recognisable as this species when isolated from cider.¹² The others are organisms that bear little relationship to any of the well-documented species but occur frequently in a particular fruit juice and are instantly recognisable when isolated. Such an example is *Lactobacillus collinoides*¹⁴ which is the rod most frequently occurring in fermented apple juice.

Thus, when working with a juice from fruit harvested in a particular vicinity one might expect to find a fairly specific microflora of lactic acid bacteria. These may, however, bear little similarity to lactic acid bacteria from any other habitat.

Acetic Acid Bacteria

The activities of acetic acid bacteria — Table 2 shows some of the main activities of the acetic acid bacteria and those of interest in fruit juices are described in greater detail by Frateur¹⁸ and Frateur & col.¹⁹. It will be noted that two types of acetic acid bacteria are named in Table 2 and these differ in several ways which have been listed by Carr & Shimwell¹¹. The most obvious difference between *Acetobacter* spp. and *Acetomonas* spp. is their oxidation of ethanol. The acetobacters oxidize ethanol to acetic acid and then further to CO₂ + H₂O whereas the acetomonads carry this oxidation to the acetic acid stage only. The vigour with which this is carried out by the two groups of bacteria differs. The acetobacters oxidize ethanol rapidly and can accumulate very high concentrations of acetic acid whereas the acetomonads do this only weakly. There are other differences between *Acetobacter* and *Acetomonas*, for example; the former has peritrichous flagella when motile whereas the latter has a polar configuration. In the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology² the name of *Acetomonas* has been included under the generic name *Gluconobacter* on the grounds that the latter takes precedence due to prior publication. It is not at all certain, however, that the organisms of the two groups are the same.

Acetic acid bacteria are mainly organisms of fermented products and are certainly found in association with fermenting apple and grape juice. Although the substrate that seems to stimulate their growth

Table 2

Activities of the Gram-negative bacteria of juices

Type of organism	Chemical activity	Effect on juice
<i>Acetobacter</i> spp.	Conversion of glucose into gluconic and various oxo gluconic acids. Conversion of ethanol to acetic acid. Conversion of glucose to cellulose (by <i>A. xylinum</i> only).	Production of excess acidity and destruction of sugars. Production of an acetic off-flavour. Production of a strong cartilaginous pellicle on the liquid surface.
<i>Acetomonas</i> spp.	Conversion of glucose to gluconic acid and various oxo gluconic acids. Conversion of fructose to 5-oxo fructose (2,5-D-threo-hexodiulose).	Production of excess acidity and a dark reddish brown pigment. This binds SO ₂ when added and reduces its efficiency as an antibacterial compound.
<i>Zymomonas</i> spp.	Conversion of glucose and fructose to ethanol CO ₂ + acetaldehyde + H ₂ S.	This causes loss of sugar, and an off-flavour due to the accumulated acetaldehyde and H ₂ S. The production of ethanol and CO ₂ also spoils a juice which is meant to be unfermented.

most readily is ethyl alcohol they can also utilize the sugars usually associated with fruit, such as glucose and fructose and often the organic acids as well. One specific example of a disadvantageous utilization of a sugar is the ability of certain *Acetomonas* strains to convert fructose to 5-oxofructose (2,5-D-threo-hexodiulose), Whiting & Coggins³⁵. This substance binds sulphur dioxide, thereby rendering it ineffectual. It is their ability to use these sugars and acids that make these organisms a potential danger in unfermented fruit juices, but it is probably true to say that they are found in this situation less often than lactic acid bacteria.

Methods of isolating and identifying acetic acid bacteria — These organisms being aerobic are easy to isolate. They grow well on solid media containing a rich nitrogen source such as yeast extract and a sugar or ethanol. To prevent the growth of extraneous organisms growing, a pH of 4.8 or even lower is advisable. In such media it is necessary to add about 3% of agar to ensure a firm gel after autoclaving. Acetic acid bacteria will grow over a fairly wide range of temperatures but the optimum range is from 25 - 30°C. One medium on which they grow well is made from apple juice fortified with yeast extract (AJYE) and has been described by Carr⁵.

Primary identification of these bacteria is by their motility, the fact that they are Gram negative rods, by their aerobic growth and ability to grow and produce acid in a medium with ethanol as the carbon source. The two major groups, *Acetomonas* and *Acetobacter*, can be divided into a number of species: the media and test to use for this purpose have been described in detail by Carr⁸.

Zymomonas

Zymomonas and its activities — The other Gram-negative organisms included in Table 2 are the *Zymomonas* spp. They differ from the acetic acid bacteria in being anaerobic and producing what appears to be a yeast-like fermentation. Although they ferment glucose quantitatively to ethanol and CO₂, the route by which this occurs is the Entner-Doudoroff pathway.

These are not truly bacteria of fruit juices but rather of sugary plant saps. Examples of plant juices from which these organisms have been isolated are as follows: *Agave americana* used in the manufacture of Pulque in Mexico and isolated by Lindner²⁴; the palm wine of Indonesia made from the juice of *Arenga pinnata* (the Gomuti palm) and isolated by Roelofsen³¹; the African palm wines made from *Raphia vinifera* and *Elaeis guineensis* and isolated by van Pee & Swings²⁸.

Zymomonas was also isolated from beer by Shimwell³³ in 1937 and this might be regarded as similar in composition to the plant saps mentioned previously. The only fruit juice from which *Zymomonas* has been isolated is fermenting apple juice. The first record of this organism was in a paper by Barker & Hillier¹. It was not named but simply referred to as the cause of "cider sickness". It is, however, clear from the description that it was a strain of what later became known as *Zymomonas*. This was not confirmed until some forty years later by Millis²⁷. The probable reason for *Zymomonas* spp. not being distributed more widely is one of pH. This bacterium will not grow below pH 3.7²⁷ and most

fruit juices fall below this level. Certain cider apple varieties are low in acid and yield juices of high pH and it is in these that this organism will grow. It was also found by Carr & Passmore¹³ in apple pulp prepared for cider.

At present there are two species of this organism, *Z. mobilis* and *Z. anaerobia* which are mainly differentiated by the fact that the former ferments glucose, fructose and sucrose whereas the latter ferments only the first two and not sucrose. All available evidence suggests that there ought to be one species^{15, 30}. A proposal has been made that there should be a type species *Z. mobilis*²³ and a sub-species *pomaceae*^{27, 34}.

Methods of isolating and identifying Zymomonas spp. — Colonies of these bacteria after 5-7 days' incubation are quite large and have been described in some detail by Millis²⁷. They grow well on apple juice plus yeast extract and generally flourish under similar conditions to those suitable for lactic acid bacteria, e.g. they require conditions of restricted oxygen if grown on solid medium. An essential ingredient of all media for zymomonads is either glucose or fructose. Without one of these sugars these organisms cannot grow at all.

Primary identification may be made by observing the following: extreme motility and intense fermentation when young; microaerophilic Gram-negative rods; the production of gas but no acid from glucose, fructose and sometimes sucrose.

Other bacteria found in fruit juices — There are a number of "fringe" bacteria associated with fruit which can be isolated on the standard media but whose existence in the fruit juice is short lived and therefore of no practical importance. Such organisms are subsequently described under the heading of the juice in which they occur.

Apple juice — Amongst the most important of these are the fermentative organisms. These can often be found in isolation media showing the symptoms of *Zymomonas* spp., namely the vigorous evolution of gas by cells that are motile and which prove on examination to be Gram negative. It is because their superficial appearance is similar to species of *Zymomonas* that it is important to know of their existence. Such organisms have been found on harvested apples, in orchard soil and in expressed juice. They resemble *Enterobacter* and *Citrobacter* species.

Orange juice — Many organisms have been isolated from orange juice. At one time when the frozen pack was introduced into the USA it was feared that this might be creating a potentially dangerous situation. Pathogens such as *Salmonella* species might find their way into the juice and although this provided a

hostile environment for such bacteria, the act of freezing would preserve them. It was hoped to produce hygienic standards by the estimation of *E. coli* in the juice. The occurrence of these bacteria, however, was so sporadic that it was concluded they were not a reliable index of contamination. Some samples contained considerable numbers of *E. coli* whilst others had none. Other strains were, however, found from time to time and included *Escherichia freundii*, *E. intermedium*, *Serratia marcescens*, *Erwinia* spp., *Enterobacter aerogenes*.

Grape juice and wine — Like most fruit juices this can support the growth of those organisms that are acid tolerant, such as the lactic and acetic acid bacteria. There is little evidence for the growth or, indeed, the survival of bacteria that are not acid tolerant in wines. This is probably due to the low pH levels combined with the high alcohol concentrations. Gini & Vaughn²⁰ reported the presence of certain species of *Bacillus* in wines. They suggested that since *B. coagulans* and *B. circulans* are often associated with flat, sour spoilage of acid canned foods it was not surprising to find these species. Likewise, *B. macerans* had been detected previously in wines and was isolated again. The remaining species isolated, namely, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. pumilis* and *B. pantothenticus* are not usually acid tolerant.

Harmful bacteria in fruit juices — These may be divided into two categories, (a) those which are harmful to the flavour and (b) those which are harmful to the consumer. The first of these are the usual acid tolerant bacteria which bring about such chemical changes to the constituents that they render the product unacceptable. These are fairly common. Those in the second category are not likely to occur since they cannot survive for long in acid conditions. There are, however, one or two juices where special care is required, most particularly tomato juice, which has a pH on the borderline of some organisms to survive.

Even though fruit juices may not support the growth of pathogens it would be foolish to assume this as an invariable rule. It is possible that due to unforeseen circumstances a fruit juice might become contaminated with a pathogen and that it could survive even for a short time. It is thus essential that the processing plant should be kept at a high standard of hygiene and that the means for detecting enteric organisms in particular should be used routinely.

Methods for Preventing the Growth of Undesirable Micro-Organisms in Fruit Juices

Once a juice has been extracted from a fruit it then becomes vulnerable to the activities of micro-organisms such as moulds, yeasts and bacteria. The

handling of large volumes of juices presents two problems to the processor: first, to preserve the juice in large bulk storage, and secondly to preserve the juices when they have been distributed in suitable containers for vending.

Bulk Storage

Chemical methods of bulk storage — There are not too many of these available on a large scale. It is possible to use high concentrations of such substances as SO₂ and it is sometimes done with certain white wines. If this is done it means that some sort of dilution has to be carried out before the product can be marketed. The reason for this is that in order to hold a large bulk of juice against microbial activity it is generally necessary to use a concentration of preservative much higher than would normally be permitted in the final product.

Physical methods of bulk storage — (a) *Concentration*. This can be done under vacuum so that the heat applied is not sufficient to damage the flavour. During this process the volatile aroma compounds can be stripped off, concentrated, stored separately and added back later. The main bulk is then depectinized and usually concentrated to about 1/6 to 1/7th of its original volume so that it forms a syrup which is much less vulnerable to the attack of micro-organisms with the exception of osmophilic yeasts. So-called half concentrates may be prepared by a reduction to about 1/3rd volume. These, however, require storage at a low temperature and impregnation with CO₂ to prevent microbial growth. (b) *Refrigeration*. Sterile juices can be stored in stainless steel or glass lined tanks cooled down to about 1°C. This stops the growth of micro-organisms and as an added precaution an inert gas such as CO₂ or N₂ may be used over the surface. The danger here is from the growth of psychrophilic micro-organisms. As these grow fairly slowly it is unusual to be troubled with them during a fairly short term storage.

Preservation for Sale

Having expressed the juice and preserved it in storage until required, the next phase is to distribute it in suitable containers and to handle it in such a way that it is preserved from microbial action until purchased by the consumer.

The methods used for this will vary to some extent with the product and the preservative regulations prevailing in the part of the world where the juices are to be sold. Like the methods of preservation used in bulk storage those used for pre-sales in small containers can be divided into chemical and physical.

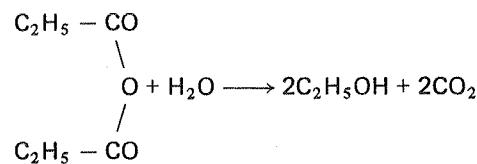
Chemical methods of preservation — Sulphur dioxide. This substance, SO₂, has been used in the preservation of wines and ciders in Europe since the 16th century. At present there is some international concern about its excessive use even though there is not very much evidence to suggest that its ingestion causes any specific disease. The problem today is that its very efficiency makes it a popular preservative used in soft and fermented drinks and many items of foodstuff, for example, sausages. Thus, urban man is swallowing ever increasing doses of this substance which is raising much concern about long term effects on his physiology.

Sulphur dioxide exists in solution either in the molecular (SO₂) or ionic forms and not as H₂SO₃. When added to water the following reactions occur:

1. SO₂ + H₂O → H⁺ + HSO₃⁻ (bisulphite ion)
2. HSO₃⁻ → H⁺ + SO₃²⁻ (sulphite ion)

It is the molecular form that is most toxic to micro-organisms although some anti-microbial activity has been ascribed to the ionic forms. Its activity increases the lower the pH. It is thus well suited for use in acid fruit juices³². Sulphur dioxide is a highly reactive compound and one of the substances it combines with readily is oxygen. In doing so it creates reducing conditions which prevent darkening due to enzymic oxidation and other disadvantageous oxidative changes. Thus SO₂ has a dual function for not only will it prevent the growth of micro-organisms but also undesirable oxidations which may spoil the colour and flavour. One disadvantage of SO₂ is that it combines too readily with the chemical groupings CO and CHO. For example, Burroughs^{3,4} identified in "dry" (devoid of sugar) ciders several sulphite binding compounds such as D-xylose, acetaldehyde, L-xylosone, D-galacturonic acid, pyruvic acid and α-oxoglutaric acid. There is present universally in unfermented juices the sugar glucose which binds SO₂ thus causing it to be only slightly antimicrobial.

Diethyl pyrocarbonate (DEPC) — This substance is one of the more modern compounds used in soft and fermented drinks to kill undesirable micro-organisms. DEPC can inhibit a very wide range of moulds, yeasts and bacteria²². It has the following structure and is easily decomposed by water as shown:



DEPC has certain disadvantages: (a) it can cause irritation in the mouth of certain consumers; (b) substances other than C₂H₅OH and CO₂ are formed from its decomposition which may be harmful to the consumer; (c) when reacting with ammonia it forms

urethane which lingers in the drink and is a known carcinogen; (d) it has no residual antimicrobial effect like SO₂.

Other chemical preservatives — There are many other chemical preservatives and the number increases daily. Two of the best known are benzoic and sorbic acids. Their use is restricted or allowed according to the regulations of various countries. For example, benzoic acid is allowed at a level of 160ppm in certain fruit juice preparations in Britain, sorbic acid is not. Benzoic acid, like SO₂, is well suited for use in fruit juices because its effect is greatest in the undissociated form. A glance at Microbial Inhibitors in Food²⁶ gives a wide range of preservatives.

Not all chemical preservatives are added since some are naturally formed. For example, Powers²⁹ has shown that anthocyanins and related compounds can have a marked effect upon certain bacteria such as *Salmonella typhosa*, *S. enteritidis*, *Shigella paratyphiiae*, *Staph. aureus*, *Aerobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* and *Clostridium* sp. (putrefactive anaerobe N° 3679). More research is required on the antimicrobial effect of phenolic and related compounds.

Physical methods of preservation — *The application of heat.* This is the most usual method of preservation by physical means and it can be applied in a number of different ways. Properly operated, the high temperature short time method of pasteurization is one of the most satisfactory because the juice receives a minimum of heating, and thus alters the flavour less than other types of heating.

Another kind of heating is in-vessel pasteurization. This applies to bottles and to cans. The advantage is that the container and contents are heated simultaneously after it has been sealed. In the flash pasteurization system the sterile juice has to be passed to a container previously sterilized, which must then be closed by a cap or stopper if it is a bottle or a lid if it is a can. The disadvantage of in-vessel pasteurization is that it requires a longer heating period to ensure that all the contents have reached the required temperature. It is common practice nowadays to fill juices hot into their containers.

There is no doubt that heating is a widely used method of preservation which in combination with the low pH's of most fruit juices kills micro-organisms. Like DEPC, heating imparts no long lasting protection against fresh microbial infection.

Filtration — This is only suitable for clear juices such as apple. Those which contain suspended fruit particles such as tomato and citrus juices cannot be filtered. Filtration has the advantage of being a cold

process and thus unlikely to change the flavour.

The commonest form of filtration is by the use of asbestos/cellulose sheets of a texture sufficiently fine to hold back micro-organisms. Generally this is a two stage process. The first is removal of visible suspended particles by a coarse filter leaving the juice bright in appearance but not sterile. The next stage is passage through a filter that has been heat sterilized with the filter sheets in position. Juice emerging on the sterile side is brilliantly clear and free from micro-organisms. This means that machinery subsequent to the sterile filter must be sterile. Thus, all holding tanks, pipe lines and filling machines must all be sterile to prevent contamination of the sterile juice.

The most common substances for filter pads are asbestos and cellulose. Even though the type of asbestos used in filters is non-carcinogenic, processors are turning more towards the use of cellulose membrane type filters. Because the membranes are thinner the apparatus used to hold the filter sheets is smaller and the chances of leaching out undesirable substances from the filter sheets is less. The precautions specified for the use of the asbestos filter sheets apply equally to the membrane filters.

Freezing — This is a suitable method for selling juices such as orange. It means that the juice can be deep-frozen into blocks of suitable size, packaged and sold to the public. One great advantage is that the juice retains a fresh flavour and aroma for a considerable time. Disadvantages are that preservation by freezing adds to the cost and is only suitable in a population where a high percentage own freezers. If allowed to thaw and not refrozen, the juice will undergo fermentation and the effect of other microbial activities. Perhaps the most serious disadvantage of all is if the juice becomes contaminated with a pathogen just before freezing. Normally such an organism would die fairly rapidly in the acid conditions of a fruit juice. The freezing process might preserve such an organism which might remain dormant until ingested by a consumer.

Irradiation — This form of sterilization is largely academic and seems likely to remain so. Although it kills micro-organisms it also causes undesirable chemical changes to take place which can alter the flavour adversely. It may be overcome, to some extent, by using small amounts of chemical preservative and bombarding the juice with low doses of radiation. This has the effect of killing micro-organisms without damaging flavour.

The other factor against its general use is that many precautions must be used in handling a radio-active source which needs special apparatus and highly trained personnel. Without such precautions, many operatives in a fruit juice factory housing a radio-active source would be in danger.

References

1. BARKER, B.T.P. & HILLIER, V.F. — Cider sickness. *J. agric. Sci.*, 5:67—85, 1912.
2. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY — 8th Edn, Eds R.E. Buchanan & N.E. Gibbons. Baltimore. The Williams & Wilkins Co., 1975.
3. BURROUGHS, L.F. — Quantitative aspects of free and bound sulphur dioxide in cider. In *Microbial Inhibitors in Food*. Ed. N. Molin. 4th International Symposium on Food Microbiology. Stockholm. Almqvist & Wiksell: 133—135, 1964.
4. BURROUGHS, L.F. — Sulphur dioxide in cider making. *Rep. Long Ashton Res. Stn for 1964*: 45—46, 1965.
5. CARR, J.G. — The lactic acid bacteria of cider, 1: some organisms responsible for the malo-lactic fermentation. *Rep. Long Ashton Res. Stn for 1952*: 144—150, 1953.
6. CARR, J.G. — Bacteria of apples. *Rep. Long Ashton Res. Stn for 1963*: 167—172, 1964.
7. CARR, J.G. — Biological Principles in Fermentation. London. Heinemann Educational Books Ltd: 1968.
8. CARR, J.G. — Methods for Identifying Acetic Acid Bacteria. In *Identification Methods for Microbiologists* Part B. Eds B.M. Gibbs & D.A. Shapton. London. Academic Press: 1—8, 1968.
9. CARR, J.G. — Tetrad forming cocci in ciders. *J. appl. Bact.*, 33:371—379, 1970.
10. CARR, J.G. — Lactics of the world unite! In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Eds J.G. Carr; C.V. Cutting & G.C. Whiting. Proceedings of the 4th Long Ashton Symposium, 1973: 369—380, 1975.
11. CARR, J.G. & SHIMWELL, J.L. — The acetic acid bacteria 1941—61. *Antonie van Leeuwenhoek*, 27: 386—400, 1961.
12. CARR, J.G. & DAVIES, PATRICIA A. — Homofermentative lactobacilli of ciders including *Lactobacillus mali* nov. spec. *J. appl. Bact.*, 33: 768—774, 1970.
13. CARR, J.G. & PASSMORE, SUSAN M. — Discovery of the "Cider Sickness" bacterium *Zymomonas anaerobia* in apple pulp. *J. inst. Brew.*, 77: 462—466, 1971.
14. CARR, J.G. & DAVIES, PATRICIA A. — The ecology and classification of strains of *Lactobacillus collinoides* nov. spec.: a bacterium commonly found in fermenting apple juice. *J. appl. Bact.*, 35: 463—471, 1972.
15. DADDS, M.J.S.; MARTIN, P.A. & CARR, J.G. — The doubtful status of the species *Zymomonas anaerobia* and *Z. mobilis*. *J. appl. Bact.*, 36: 531—539, 1973.
16. DAVENPORT, R.R. — Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis*, 13: 123—130, 1974.
17. FORNACHON, J.C.M.; DOUGLAS, H.C. & VAUGHN, R.H. — The pH requirements of some heterofermentative species of *Lactobacillus*. *J. Bact.*, 40: 649—655, 1940.
18. FRATEUR, J. — Essai sur la systematique des Acetobacters. *La Cellule*, 53: 287—392, 1950.
19. FRATEUR, J.; SIMONART, P. & COULON, T. — Étude chromatographique de cultures d'Acetobacter. *Antonie van Leeuwenhoek*, 20: 111—128, 1954.
20. GINI, B. & VAUGHN, R.H. — Characteristics of some bacteria associated with the spoilage of California dessert wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 13: 20—31, 1962.
21. GASSE, F. & MANDEL, M. — DNA base composition of the genus *Lactobacillus*. *J. Bact.*, 96: 580—587, 1968.
22. GENTH, H. — On the action of diethyl pyrocarbonate on micro-organisms. In *Microbial Inhibitors in Food*. Ed. N. Molin. 4th International Symposium of Food Microbiology. Stockholm. Almqvist & Wiksell: 77—85, 1964.
23. KLUYVER, A.J. & van NIEL, C.B. — Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zbl. Bakt. (Abt II)*, 94: 369—403, 1936.
24. LINDNER, P. — Garungsstudien über Pulque in Mexiko. *Ber. Westpreuss Bot. Vereins*, 50: 253—255, 1928.
25. MANN, J.C. de; ROGOSA, M. & SHARPE, M. ELISABETH. — A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.*, 23: 130—135, 1960.
26. MICROBIAL INHIBITORS IN FOOD — Ed. N. Molin. 4th International Symposium on Food Microbiology. Stockholm. Almqvist & Wiksell: 1964.
27. MILLIS, NANCY F. — A study of the cider sickness bacillus — a new variety of *Zymomonas anaerobia*. *J. gen. Microbiol.*, 15: 521—528, 1956.
28. PEE, W. van & SWINGS, J. — Le vin de palme. Etude chimique et microbiologique. Monographie Office National de la Recherche et du Développement (ONRD). Kinshasa (Zaire): 1972.
29. POWERS, J.J. — Action of anthocyanin and related compounds on bacterial cells. In *Microbial Inhibitors in Food*. Ed. N. Molin. 4th International Symposium on Food Microbiology. Stockholm. Almqvist & Wiksell: 59—75, 1964.
30. RICHARDS, M. & CORBEY, D.A. — Isolation of *Z. mobilis* from primed beer. *J. Inst. Brew.*, 80: 241—244, 1974.
31. ROELOFSEN, P.A. — De alkohol bacterie in arensap. *Natuurw. Tijdschr. Ned.-Indie*, 101:274, 1941.
32. SCHOLEY, J. & RAWLINSON, A.P. — Control of microbial spoilage in low pH products with SO₂. In *The Role of Sulphur Dioxide in Food Processing*. Chemy Ind.: 716—717, 1974.
33. SWINGS, J.G. — Taxonomie van het Bakteriengeslacht *Zymomonas* Kluyver en van Niel (1936). Overdruk van de Bekroonde Inzending voor de Kluyverprys. Rijksuniversiteit van Gent. Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, 1974.
34. WHITING, G.C. & COGGINS, R.A. — Formation of 2,5-D-Threo-diketohexose. Chemy Ind.: 1925—1926, 1963.
35. WILLIAMS, R.A.D. — A review of biochemical techniques in the classification of lactobacilli. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Eds J.G. Carr; C.V. Cutting & G.C. Whiting. Proceedings of the 4th Long Ashton Symposium, 1973: 369—380, 1975.