

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE GRUPOS DE BACTÉRIAS EM SUCOS DE LARANJA AO NATURAL *

Dirceu do Nascimento **
Sirdeia M. P. Furlanetto ***

NASCIMENTO, D. do & FURLANETTO, S.M.P. Determinação quantitativa de grupos de bactérias em sucos de laranja ao natural. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 15:221-35, 1981

RESUMO: Foi realizada investigação com a finalidade de se conhecer a microbiota aeróbia do suco de laranja ao natural oferecido ao consumo público, através das contagens de bactérias mesófilas e ácido-produtoras, e da determinação do número mais provável (NMP) de bactérias coliformes totais e fecais e de estreptococos fecais.

UNITERMOS: Alimentos, microbiologia. Suco de frutas naturais. Suco de laranja.

INTRODUÇÃO

O estabelecimento de padrões de qualidade para os alimentos e de especificações quanto aos limites de tolerância, relativos a microrganismos patogênicos, dependem do conhecimento prévio da microbiota desses produtos bem como da influência que fatores regionais exercem sobre o número e os tipos de microrganismos encontrados.

No Brasil, no que se refere a sucos de laranja ao natural, tanto na área de Saúde Pública como na indústria, não existem informações que permitam o estabelecimento de parâmetros que se ajustem a nossa realidade e às nossas necessidades. Dada a evidência deste problema, os padrões micro-

biológicos adotados^{10,21,31} para sucos de frutas são tentativos, devendo-se frisar que dependendo de estudos sobre a microbiologia desses produtos, tais padrões poderão ser alterados.

Assim sendo, tendo em vista a necessidade de se oferecer subsídios para o estabelecimento de padrões concordes com as condições de nosso país, resolvemos verificar a presença de microrganismos deteriorantes assim como daqueles considerados como indicadores de poluição fecal em amostras de suco de laranja servido ao natural.

* Extraído da tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 1977, subordinada ao título "Flora microbiana de sucos de laranja ao natural", para a obtenção do grau de Mestre em Ciências dos Alimentos

** Do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba — Cidade Universitária — 58000 — João Pessoa, PB — Brasil.

*** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — Setor Saúde Pública — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de suco de laranja utilizadas neste trabalho foram colhidas em dez lanchonetes e restaurantes da Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", da Universidade de São Paulo. De cada estabelecimento foram obtidas dez amostras, perfazendo o total de cem.

Como as nossas condições não permitiam o exame simultâneo de todas as amostras, numa única amostragem, esta foi feita parcialmente, coletando-se duas ou três amostras por vez, uma em cada lugar diferente, até completar dez amostras para cada estabelecimento.

Mais dez amostras de suco foram colhidas em domicílios, nas condições normais de higiene caseira, na tentativa de se obter um parâmetro de comparação para a análise das amostras estudadas.

O suco foi coletado em frascos estéreis de 450 ml, fechados com tampas também estéreis e acondicionados em caixa de material isotérmico, com gelo, e transportados para o laboratório. A quantidade de suco coletada foi da ordem de 150-200 ml. O tempo decorrido entre a coleta das amostras e o início do seu exame microbiológico, em nenhum caso excedeu a 45 min.

No laboratório, o suco foi homogeneizado, após o que foi diluído de 10^{-1} à 10^{-6} usando-se como diluente água tamponada fosfatada estéril.

O suco de laranja ao natural, apesar de apresentar pH 3,4 a 4,5, não foi neutralizado antes da análise microbiológica, pois um "teste piloto", realizado com vinte amostras, indicou não haver diferenças quando comparamos os resultados do suco neutralizado com os do não neutralizado. A neutralização foi feita com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 N.

Contagem padrão de bactérias mesófilas em placas (segundo Thatcher e Clark ³⁴, 1973), depositaram-se porções de 1 ml das diluições em placas de Petri estéreis, às

quais eram adicionadas 15 ml de ágar glicose — extrato de levedo — triptona fundido e resfriado a 43°C. Após homogeneização e solidificação do ágar, as placas eram incubadas a 35°C por 48 h. Em seguida, selecionavam-se as placas contendo entre 30 e 300 colônias. Nestas placas, era contado o número de colônias, o qual era multiplicado pela recíproca da diluição correspondente, afim de se apresentar o resultado como número de bactérias por ml de suco.

Contagem de bactérias ácido-produtoras (segundo Sharf ³³, 1972). Inoculou-se na superfície de ágar glicose-extrato de levedo-triptona adicionado de 0,04% de púrpura de bromocresol, 0,1 ml de cada diluição decimal de suco. Em seguida, o inóculo era espalhado sobre a superfície do meio, com alça de Drigalsky esterilizada e as placas incubadas a 35°C por 3-5 dias. Após a incubação, eram contadas as colônias que apresentavam forte reação ácida, em placas com 30 a 300 colônias e o resultado era referido como número de bactérias ácido-produtores por ml da amostra original.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes (segundo Thatcher e Clark ³⁴, 1973).

Prova Presuntiva: Inoculou-se, em triplicata, 1 ml de cada diluição da amostra em três tubos contendo caldo lactosado com tubo de Durham, os quais eram incubados a 35°C por 24 e 48 h. Após esse período, a presença de gás nos tubos de caldo lactosado indicava provas presuntivas positivas para bactérias do grupo coliforme.

Prova Confirmatória: Transferia-se uma alçada de cultura de cada tubo com prova presuntiva positiva, para um tubo de caldo lactosado-bile-verde brilhante com tubo de Durham. Ao mesmo tempo, semeava-se uma alçada da cultura, em estrias, na superfície de ágar eosina azul de metileno, em placas. Os tubos e placas eram, a seguir, incubados a 35°C por 24 h. Considerava-se a prova

confirmatória positiva quando havia produção de gás nos tubos de caldo lactosado-verde brilhante e/ou a presença de colônias negras ou claras com centro negro no ágar eosina azul de metileno.

Prova Completa: A partir de cada uma das placas de eosina azul de metileno positivas na prova confirmatória, isolava-se uma colônia com características das de coliformes e a mesma era semeada em dois tubos contendo respectivamente, caldo lactosado com tubo de Durham e ágar simples inclinado. Após incubação a 35°C por 24-48 h, se o tubo de fermentação se revelasse com produção de gás, preparava-se a partir da cultura em ágar simples inclinado correspondente, um esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram. A presença de bastonetes não esporulados e Gram-negativos, no ágar simples inclinado e a produção de gás no tubo de caldo lactosado correspondente constituía a prova completa positiva para bactérias do grupo coliforme. A partir do número de porções positivas da prova confirmatória, determinava-se o NMP de bactérias coliformes por 100 ml da amostra original empregando-se, para tal, a tabela de Hoskins (American Public Health Association^{1,2}).

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais (segundo Thatcher e Clark³⁴, 1973). Após as leituras dos tubos de caldo lactosado da prova presuntiva para coliformes, transferia-se uma alçada de cultura do material de cada tubo positivo para um tubo correspondente de caldo EC, contendo tubo de Durham, procedendo-se a seguir a incubação em banho-maria a 44,5°C por 24 h. Após este período, a presença de gás indicava prova positiva para coliformes fecais. Em seguida, a partir do número de tubos positivos, determinava-se o NMP dessas bactérias por 100 ml de amostra, através da tabela de Números Mais Prováveis^{1,2}.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de estreptococos fecais (segundo Sharf³³, 1972). Na prova presuntiva, inoculou-se em triplicata, 1 ml de cada diluição da amostra em três tubos de caldo dextrose-azida, os quais eram a seguir incubados a 35°C por 24-48 h. Após a incubação, a presença de crescimento bacteriano indicava prova presuntiva positiva. De cada tubo positivo transferia-se uma alçada da cultura a um tubo de caldo etil violeta-azida, sendo os mesmos, a seguir, incubados a 35°C por 24 e 48 h. Se houvesse crescimento bacteriano evidente com formação de um botão de cor violeta no fundo, considerava-se a prova confirmatória positiva do número de porções positivas das amostras e determinava-se o NMP empregando-se para isto a Tabela de Hoskins^{1,2}.

RESULTADOS

Na Tabela 1, encontram-se os resultados das determinações feitas a partir de cada uma das 10 amostras de suco de laranja, colhidas em dias diferentes em dez lanchonetes ou restaurantes.

Na Tabela 2, constata-se que a contagem total de bactérias apresentou maior frequência de resultados entre 10^5 e 10^6 microrganismos por ml. Quanto à contagem de bactérias ácido-produtoras, embora em cinquenta das amostras não tenhamos constatado seu crescimento, nas restantes positivas, os valores encontrados estavam com maior frequência, também, entre 10^5 e 10^6 microrganismos por ml.

Na Tabela 3, pode-se verificar que em 76 amostras os NMP de estreptococos fecais foram de 10^4 ou mais microrganismos por 100 ml. Para coliformes totais, 48 amostras revelaram-se com NMP de zero a 3/100 ml enquanto para 52 esse valor era de 10 ou mais/100 ml, sendo o resultado mais freqüente o compreendido entre 10 e 10^3 /100 ml. Para coliformes fecais, 92 das 100 amostras examinadas revelaram-se com NMP de zero a 3/100 ml.

T A B E L A 1

Número de microrganismos determinados para cada uma das 100 amostras de suco de laranja "ao natural" colhidas em dias diferentes, em 10 diferentes estabelecimentos.

Amostra Nº	Número de Microrganismos/ml		NMP/100 ml		Estreptococos Fecais
	Contagem Total de Bactérias Mesófilas	Contagem de Bactérias Ácido-Produtoras	Coliformes Totais	Fecais	
1	32.000	390.000	30	< 3	460.000
2	369.000	850.000	160	< 3	1.200.000
3	510.000	558.000	30	< 3	240.000
4	270.000	9.900	< 3	< 3	930.000
5	49.000	17.500	94	< 3	190
6	218.000	15.300	< 3	< 3	2.400.000
7	430.000	— *	60	< 3	11.000.000
8	17.200	—	< 3	< 3	2.300
9	990.000	—	90	< 3	43.000
10	81.000	—	< 3	< 3	11.000.000
11	79.000	340.000	< 3	< 3	24.000.000
12	236.000	310.000	< 3	< 3	290.000
13	360.000	1.200	62	< 3	230.000
14	48.000	45.000	190	< 3	150.000
15	240.000	—	200	< 3	150.000
16	370	—	< 3	< 3	230
17	35.000	—	< 3	< 3	43.000
18	280.000	—	< 3	< 3	1.100.000
19	440.000	—	< 3	< 3	9.300
20	35.000	—	94	< 3	43.000
21	448.000	300	230	< 3	93.000
22	790.000	—	30	< 3	73
23	290.000	28.000	36	< 3	< 3
24	71.000	—	91	< 3	750
25	790.000	—	< 3	< 3	930

T A B E L A 1 (Continuação)

Número de microrganismos determinados para cada uma das 100 amostras de suco de laranja "ao natural" colhidas em dias diferentes, em 10 diferentes estabelecimentos.

Amostra Nº	Número de Microrganismos/ml		NMP/100 ml		
	Contagem Total de Bactérias Mesófilas	Contagem de Bactérias Ácido-Produtoras	Coliformes Totais	Fecais	Streptococos Fecais
26	2.700.000	—	< 3	< 3	430.000
27	22.500	—	< 3	< 3	73
28	720.000	2.200.000	92	< 3	4.600.000
29	161.000	—	930	230	73
30	149.000	—	23.000	9.300	290
31	760.000	1.420.000	< 3	< 3	≥ 24.000.000
32	160.000	2.200.000	30	< 3	11.000.000
33	90.000	95.000	190	< 3	750.000
34	280.000	1.300.000	230	< 3	4.600.000
35	150.000	18.000	60	< 3	930.000
36	160.000	120.000	30	< 3	930.000
37	710.000	—	60	60	4.600.000
38	2.200.000	—	< 3	< 3	430.000
39	1.100.000	1.020.000	< 3	< 3	< 3
40	2.200.000	—	90	< 3	2.100.000
41	460.000	9.000	< 3	< 3	24.000.000
42	250.000	800.000	110	< 3	430.000
43	50.000	130.000	290	< 3	930.000
44	52.000	10.000	93.000	< 3	430.000
45	2.070.000	1.500.000	30	< 3	2.100.000
46	15.700	—	< 3	< 3	23.000
47	225.000	—	36	< 3	230.000
48	190.000	—	30	< 3	1.500.000
49	300.000	6.100.000	61	< 3	≥ 24.000.000
50	340.000	340.000	< 3	< 3	2.000

T A B E L A 1 (Continuação)

Número de microrganismos determinados para cada uma das 100 amostras de suco de laranja "ao natural" colhidas em dias diferentes, em 10 diferentes estabelecimentos.

Amostra Nº	Número de Microrganismos/ml		NMP/100 ml		
	Contagem Total de Bactérias Mesófilas	Contagem de Bactérias Ácido-Produtoras	Coliformes Totais	Fecais	Estreptococos Fecais
51	236.000	162.000	30	< 3	11.000.000
52	25.600	3.700	< 3	< 3	24.000.000
53	300.000	57.000	< 3	< 3	4.600.000
54	370.000	490.000	< 3	< 3	4.600.000
55	46.000	220.000	< 3	< 3	23.000
56	10.000.000	—	< 3	< 3	11.000.000
57	120.000	—	3.600	1.500	1.500
58	164.000	—	94	< 30	75.000
59	260.000	400.000	120	< 3	2.300.000
60	50.000	132.000	< 3	< 3	430.000
61	2.830	380	< 3	< 3	< 3
62	8.200	—	< 3	< 3	23.000
63	57.000	1.580.000	62	< 3	23.000
64	3.800	100	61	< 3	7.500
65	500	59	< 3	< 3	< 3
66	300.000	—	< 3	< 3	4.600.000
67	100.000	—	< 3	< 3	15.000
68	16.000	—	190	< 3	36
69	13.000	8.000	1.200	< 3	240
70	2.100	—	< 3	< 3	23.000
71	216.000	—	< 3	< 3	23.000
72	74.000	1.900	< 3	< 3	23.000
73	223.000	300.000	360	< 3	15.000
74	1.070.000	—	< 3	< 3	930.000
75	1.090.000	—	< 3	< 3	4.300

T A B E L A 1 (Continuação)

Número de microrganismos determinados para cada uma das 100 amostras de suco de laranja "ao natural" colhidas em dias diferentes, em 10 diferentes estabelecimentos.

Amostra Nº	Número de Microrganismos/ml		NMP/100 ml		
	Contagem Total de Bactérias Mesófilas	Contagem de Bactérias Ácido-Produtoras	Coliformes Totais	Fecais	Estreptococos Fecais
76	9.000	—	< 3	< 3	4.300
77	96.000	—	2.300	< 3	43.000
78	598.000	—	36	< 3	43.000
79	15.000	—	530	< 3	15.000
80	208.000	—	< 3	< 3	93.000
81	490.000	60.000	2.300	2.300	210.000
82	120.000	600.000	< 3	< 3	4.600.000
83	800.000	1.000.000	< 3	< 3	430.000
84	470.000	—	< 3	< 3	23.000
85	40.000	—	< 3	< 3	< 3
86	740.000	—	< 3	< 3	23.000
87	1.300.000	900.000	< 3	< 3	430.000
88	1.600.000	—	30	< 3	360
89	227.000	2.400.000	< 3	< 3	43.000
90	5.000.000	—	< 3	< 3	1.500.000
91	30.000	1.200.000	120	< 3	2.400.000
92	1.060.000	12.900.000	61	< 3	4.600.000
93	25.000	1.070.000	< 3	< 3	430.000
94	320.000	—	< 3	< 3	2.100
95	74.000	—	< 3	< 3	430.000
96	24.100.000	—	190	< 3	430.000
97	492.000	—	240.000	< 3	4.600.000
98	100.000	—	460.000	< 30	4.600.000
99	500.000	—	460.000	15.000	2.400.000
100	690.000	10.000	30	< 3	≥ 24.000.000

* Ausência de Crescimento.

T A B E L A 2

Distribuição da contagem total de bactérias mesófilas e contagem de bactérias ácido-produtoras em 100 amostras colhidas em 10 diferentes estabelecimentos.

Número de Microrganismos/ml	Número de Amostras	
	Contagem Total de Bactérias Mesófilas	Contagem de Bactérias Ácido-Produtas
0	0	50
1 ----- 10	0	0
10 ----- 10 ²	0	2
10 ² ----- 10 ³	2	2
10 ³ ----- 10 ⁴	5	8
10 ⁴ ----- 10 ⁵	29	8
10 ⁵ ----- 10 ⁶	51	18
10 ⁶ ----- 10 ⁷	12	11
10 ⁷ ----- 10 ⁸	1	1

Na Tabela 4, encontra-se a distribuição dos resultados das análises microbiológicas das dez amostras de suco de laranja ao natural, colhidas em dez domicílios, apenas como elementos de comparação entre as condições microbiológicas dos sucos extraídos com os cuidados domésticos habituais com as daqueles coletados em casas comerciais.

DISCUSSÃO

São de consenso geral os problemas de Saúde Pública acarretados pelos alimentos contaminados, bem como a preocupação de se eliminar os microrganismos patogênicos e não, obrigatoriamente, todos os microrganismos presentes nesses produtos. Deve

ser salientado porém que, quando esses produtos são submetidos a exames microbiológicos na indústria, geralmente os microrganismos patogênicos não são pesquisados dada a sua grande diversidade, o seu custo e as dificuldades técnicas para a sua realização. Tais pesquisas são, no entanto, realizadas excepcionalmente quando o alimento é suspeito de estar associado a um surto ou a casos de uma determinada doença. Assim, a análise microbiológica de alimentos baseia-se na determinação, qualitativa ou quantitativa, de grupos de microrganismos denominados "indicadores", tais como as bactérias coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais ^{5,14,15,19,28,34}.

T A B E L A 3

Distribuição do NMP de coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais em 100 amostras colhidas em 10 diferentes estabelecimentos.

NMP/100 ml	Número de Amostras		
	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Estreptococos Fecais
0 —— 3	48	92	5
3 —— 10	0	0	0
10 —— 10 ²	28	3	4
10 ² —— 10 ³	15	1	7
10 ³ —— 10 ⁴	4	3	8
10 ⁴ —— 10 ⁵	2	1	20
10 ⁵ —— 10 ⁶	3	0	25
10 ⁶ —— 10 ⁷	0	0	20
10 ⁷ —— 10 ⁸	0	0	11

T A B E L A 4

Número de microrganismos determinados para cada uma das 10 amostras de suco de laranja "ao natural" colhidas em dias diferentes e diferentes residências sob os cuidados higiênicos usuais.

Amostra Nº	Contagem Total de Mesófilas	Número de Bactérias			
		Contagem de Ácido-Produtoras	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Estreptococos Fecais
1	280.000	— *	43.000	< 3	< 3
2	123.000	—	23.000	< 3	210
3	193	730	< 3	< 3	< 3
4	7.000	—	< 3	< 3	200
5	20.000	—	43.000	< 3	4.300
6	2.000	10.000	90	< 3	200
7	3.000	—	< 3	< 3	62
8	1.200	—	43.000	< 3	190
9	230.000	97.000	< 3	< 3	4.600.000
10	3.100	20.000	190	< 3	160

* Ausencia de Crescimento.

As bactérias coliformes, de fácil cultivo, geralmente estão associadas a organismos patogênicos intestinais, sendo bons indicadores de poluição fecal. Este grupo de bactérias é constituído principalmente pela *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter intermedium* e *Klebsiella*². Entretanto, é sabido que nem todos os coliformes são seguramente fecais, pois podem ter sua origem no solo ou em vegetais^{8,14,15}.

Quanto aos coliformes fecais, comuns ao homem e aos animais e também pouco exigentes quanto às condições de cultivo, é um grupo de bactérias bom indicador de poluição fecal. Número elevado desses microrganismos em qualquer alimento indicam que espécies enteropatogênicas podem também estar presentes no material examinado³⁴.

A presença de estreptococos fecais tem sido sugerida como um índice de sanidade, uma vez que esses microrganismos têm sido encontrados em alimentos tais como na água, no leite, nos alimentos congelados, nos ovos, nos peixes e nos mariscos. Larkin e col.² (1955) mostraram que é mais frequente a presença de estreptococos fecais em alimentos congelados do que os coliformes ou *E. coli*.

Sabemos que os estreptococos fecais possuem maior resistência que os coliformes, às condições do meio ambiente e aos processos de conservação normalmente aplicados aos alimentos. Esta resistência é a razão de não se preferir tomar tais microrganismos como indicadores de contaminação fecal recente, já que podem sobreviver em condições adversas. Tal fato significa que diminui a possível relação com a presença de agentes patogênicos, que, em geral, possuem menor resistência. Mesmo que houvesse agentes patogênicos chegados ao alimento ao mesmo tempo que os estreptococos fecais possivelmente persistiriam por menos tempo que estes últimos.

Porém, um alto número de estreptococos fecais em alimentos pode indicar condições

higiênicas duvidosas e possibilidade de multiplicação de microrganismos patogênicos.

Com relação aos coliformes totais e coliformes fecais em sucos de laranja ao natural, os resultados por nós obtidos no presente trabalho mostram a grande dificuldade encontrada na determinação do NMP daquelas bactérias nas amostras examinadas, uma vez que, nos tubos de concentrações mais elevadas do suco analisado, aparece menor número de germes do que nos tubos de concentrações mais baixas.

O mesmo não ocorreu para os estreptococos fecais, onde obtivemos sempre uma seqüência decrescente de número de tubos positivos, o que nos permitiu determinar o NMP dessas bactérias, sem qualquer dificuldade.

Sabemos da influência inibitória de vários microrganismos sobre a flora bacteriana da água, o que provoca uma restrição à boa detecção de bactérias do grupo coliforme, segundo os trabalhos de Waksman³⁵ (1941) e Schiavone e Passerine³² (1957). Espécies de *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Bacillus*, bolores e leveduras dificultam a detecção do grupo coliforme em água, segundo os trabalhos de Kligler²¹ (1919) e Weaver e Boiter³⁶ (1952). Foi mostrado por Reitter e Seligmann³⁰ (1957) que, quando bactérias, não coliformes, são introduzidas em caldo lactosado, podem multiplicar-se mais rapidamente o que intensificaria a inibição de coliformes, ou então, simplesmente, os sobrepujariam na população.

Hutchison e col.²⁰ (1943) detectaram poucos coliformes, quando uma suspensão de vários organismos, não coliformes, numa concentração de 10.000 a 20.000 germes/ml foi adicionada a tubos de caldo lactosado simultaneamente com uma suspensão de *Escherichia coli* com 10 germes por ml.

Segundo McCabel e col.²⁴ a qualidade bacteriológica da água de distribuição de 969 redes de abastecimento público foi

analisada com a finalidade de determinar a relação entre a contagem total de bactérias em placas e a detecção de coliformes totais e fecais. A análise feita mostrou que a detecção de coliformes totais e fecais não foi alterada com relação aos níveis de contagem-padrão até 500 germes por ml, porém a positividade diminuía quando a população de bactérias não coliformes excedia de 1.000 organismos/ml. Isto mostra também que bactérias não coliformes, presentes em grande número, afetam adversamente a detecção de bactérias coliformes.

Tais resultados não se coadunam com os dados por nós obtidos, mostrados nas Tabelas de 1 a 4, nos quais se verifica não haver relação com a contagem total de bactérias mesófilas e a determinação do NMP de coliformes totais e fecais.

Na determinação do NMP de coliformes totais, nas cem amostras de suco de laranja natural, um fato despertou-nos a atenção: quando transferíamos uma amostra do conteúdo de cada tubo positivo de caldo lactosado (prova presuntiva) para um tubo de caldo lactose bile verde brilhante (prova confirmatória), o crescimento neste meio geralmente não ocorria nas diluições menores, e sim nas diluições maiores. A isso chamaremos, para facilidade de redação, de "comportamento discutível"

Das cem amostras analisadas, trinta e uma comportaram-se dessa maneira, o que é um número alto, porém, se levarmos em consideração o número de amostras negativas (num total de 48) a percentagem de amostras que apresentaram um "comportamento discutível" chega a ser da ordem de 59,6%.

Esse "comportamento discutível" poderia ter ocorrido devido ao fato de que, nas diluições maiores, os coliformes teriam condições de sobrepujar outros microrganismos com condições então de se desenvolver e se multiplicar.

No caso específico do suco por nós analisado, é muito provável que tenha havido

um acontecimento semelhante ao que já foi verificado com a água. A água é um meio nutriente pobre, enquanto o suco de laranja natural é rico em ácidos orgânicos, sais minerais e carboidratos, segundo estudos de Barreto Junior³, tornando-se um bom meio de cultura para microrganismos que porventura aí estejam presentes.

Os fatores que poderiam contribuir para uma alta contagem de microrganismos podem ser: a superfície externa do fruto, o equipamento usado (extrator) e o interior do fruto.

A superfície externa do fruto, como fator de contaminação, é bastante discutida, pois, segundo Faville e Hill¹¹ (1951), que pulverizaram a superfície externa da laranja com organismos indicadores, tais como, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, não conseguiram isolar, posteriormente, do suco, estes germes, mesmo quando o suco de laranja pulverizada foi extraído sem uma lavagem prévia. Estes estudos estão em concordância com o trabalho de Patrick² (1950) que concluiu que o uso de laranjas com superfície limpa não garante a obtenção de um suco com baixa contagem de microrganismos.

Porém, segundo Beisel⁴ (1951), existe uma relação direta entre o grau de contaminação da superfície da laranja e a quantidade de microrganismos encontrada no suco.

Quanto à presença de coliformes na superfície da laranja, também é assunto conflitante, pois alguns trabalhos realizados por Beisel e Troy⁷ (1949), Dack⁹ (1959) e Wolford³⁸ (1956) evidenciam a presença de coliformes, ao contrário de Patrick²⁹ (1951) que não conseguiu resultados positivos. Wolford e Berry⁴⁰ (1948), Wolford³⁹ (1956) e Dack⁹ (1955) chegaram a sugerir que os coliformes fizessem parte da flora normal da laranja.

Testes laboratoriais têm mostrado que bactérias coliformes, às vezes, estão presentes no suco de laranja que sofreram

rigorosos cuidados na colheita e que foram lavadas com substâncias desinfetantes, antes da extração do suco, conforme estudos de Dack⁹ (1955) e Beisel e Troy⁵ (1949).

No estudo feito por Hill e Faville¹⁷ (1951) ficou mostrado que os microrganismos são capazes de crescer no interior da laranja, se puderem aí penetrar. Os organismos, depois de inoculados artificialmente na laranja, quando ainda na árvore, produzem uma contagem máxima de microrganismos dentro de, aproximadamente, três semanas. Esta contagem foi mantida durante o período de cinco semanas de observação.

Alguns estudos realizados por Dack⁹ (1955) e Beisel e Troy⁵ (1949) mostraram que bactérias coliformes estão presentes freqüentemente na laranja, mesmo antes desta ser colhida. Em sucos preparados com laranjas "passadas" foram encontradas duas mil e quinhentas vezes mais organismos do que naqueles preparados da mesma maneira, com laranjas sadias, segundo os estudos de Wolford e Berry⁴⁰ (1948).

Ampla variação na contagem de microrganismos pode ser observada a partir de sucos de frutos aparentemente sadios, porém a eliminação dos frutos não sadios pode diminuir, significativamente, a carga microbiológica do suco extraído^{6,16,26,40}.

Na Tabela 4 encontra-se os resultados das análises microbiológicas de dez amostras de suco de laranja ao natural, colhidas em dez domicílios. As análises desse material foram realizadas apenas para termos uma comparação entre as condições microbiológicas de sucos de laranja extraídos com os cuidados domésticos habituais e os resultados obtidos a partir das amostras coletadas em restaurantes e lanchonetes.

Pode-se verificar, analisando os resultados apresentados na Tabela 4 e comparando-os com os da Tabela 1, que foi examinado um pequeno número de amostras de suco de laranja obtidos em domicílios; as suas

condições microbiológicas foram, de forma geral, melhores que as observadas para os sucos colhidos em restaurantes e lanchonetes universitários.

Observando as Tabelas 2 e 3 podemos notar onde houve maior freqüência na distribuição dos grupos de microrganismos. A contagem padrão de bactérias mesófilas apresentou maior freqüência de resultados entre 10^5 e 10^6 microrganismos por ml; o NMP de estreptococos fecais é mais freqüente entre 10^5 e 10^6 microrganismos por 100 ml. Na contagem de bactérias ácido-produtoras, cinquenta das cem amostras analisadas resultaram negativas. Para as cinquenta restantes positivas, os valores encontrados estavam, com maior freqüência, entre 10^5 e 10^6 microrganismos por ml.

Em nosso país, quanto aos padrões legais para sucos de frutas, encontramos referências apenas com relação a coliformes totais e fecais. Assim, a Portaria nº 410 de 27/9/74 do Ministério da Agricultura²⁵ exige, como padrão para suco simples (natural) não congelado, a ausência de organismos coliformes em 5 porções de 10 ml e ausência de microrganismos patogênicos.

Em 1978, dois novos padrões para sucos de frutas foram estabelecidos. Um a nível nacional, do Ministério da Saúde³¹ e o outro para o Estado de São Paulo¹⁰. No primeiro caso, para refrescos, sucos e nectares, a Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde admite para bactérias do grupo coliforme de origem fecal, um máximo de 10/ml, nada constando a respeito de outros microrganismos. Para o Estado de São Paulo, de acordo com os padrões estabelecidos pela Secretaria da Saúde¹⁰, as características microbiológicas para sucos integrais de frutas deverão obedecer ao seguinte padrão: bactérias coliformes: máximo 100/ml; bactérias do grupo coliforme de origem fecal: ausência em 1 ml.

No presente estudo, embora seguindo uma metodologia diferente da exigida pela Por-

taria nº 410 de 27/9/74, do Ministério da Agricultura ²⁵, obteve-se maior frequência de amostras revelando-se com um NMP de coliformes totais por 100 ml menor que 3, embora tenha sido constatada a ocorrência de 24% das amostras com valores de 10^2 ou mais/100 ml. Com relação aos coliformes fecais, 92% das amostras apresentou-se com NMP igual ou inferior a 3 por 100 ml. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Nolte e Von Loesecke ²⁷ (1940), Garcia ¹³ (1944) e Wolford ³⁷ (1950) que isolaram organismos coliformes do suco de laranja. Entretanto, estão em desacordo com o verificado por Ferraro e Appleman ¹² (1956) e Patrick ^{28,29} (1950, 1951), os quais não conseguiram isolar coliformes em suco de laranja.

É também de grande importância manter o equipamento de extração do suco, em boas condições sanitárias ^{11,16,26,40}, uma vez que microrganismos podem nele multiplicar-se.

Como verificamos em nosso trabalho, a contaminação dos sucos de laranjas obtidos em restaurantes e lanchonetes, parece ser mais elevada do que aquela apresentada em amostras providas de residências e obtidas com os cuidados domésticos normais de higiene. Tais contaminações dizem respeito ao número total de germes e são evidentes na contagem de bactérias ácido-produtoras.

Queremos crer que a falta de limpeza imediata dos equipamentos extratores, bem como a exposição do suco a temperatura ambiente por um tempo prolongado, em

restaurantes e lanchonetes, permitem a multiplicação de uma grande gama de microrganismos.

Por outro lado, muitos autores ^{7,18,27,28,38}, afirmam que a aparente limpeza do extrator não está relacionada com a variação na contagem de germes do suco de laranja.

A qualidade do fruto (o interior do fruto) parece ser realmente o fator mais importante da contaminação e a maioria dos trabalhos na literatura, são a favor desta assertiva ^{7,18,27,28,38}.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos através da análise microbiológica de suco de laranja ao natural, colhido em lanchonetes e restaurantes universitários, parece-nos lícito concluir que:

1) A contagem padrão de bactérias mesófilas apresentou maior frequência de resultados entre 10^5 e 10^6 microrganismos por ml.

2) Na contagem de bactérias ácido-produtoras, 50 das 100 amostras analisadas não apresentaram crescimento. Para as 50 amostras restantes positivas, os valores encontrados com maior frequência estão entre 10^5 e 10^6 microrganismos por ml.

3) Na determinação do NMP de coliformes totais 48 das 100 amostras analisadas apresentaram valores menores que 3 por 100 ml sendo que na determinação do NMP de coliformes fecais 92 amostras apresentaram valores também menores que 3 por 100 ml.

NASCIMENTO, D. do & FURLANETTO, S.M.P. [Quantitative determination of bacteria groups in fresh, natural orange juice]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 15:221-35, 1981.

ABSTRACT: This investigation was carried out to discover the aerobic microbiota in natural orange juice served the public. Counts were made of mesophilic bacteria and acid producers, and the most probable number of totally coliform bacteria, fecal bacteria, and fecal streptococci was determined.

UNITERMS: Food microbiology. Juices. Orange juice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 12th ed. New York, 1965.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 14th ed. Washington, 1975.
3. BARRETO JUNIOR, A. *Studies on the rate of growth of potential spoilage bacteria in orange juice*. Florida, University of Florida, 1953. [Thesis — University of Florida]
4. BEISEL, C. G. Controlling contamination in a citrus canning plant. *Canner*, Chicago, 109:16-8, 1951.
5. BEISEL, C. G. & TROY, V. S. The Vaughn-Levine boric acid medium as a screening presumptive test in the examination of frozen concentrated orange juice. *Fruit Prod. J.*, Chicago, 28:356-7, 1949.
6. BERRY, J. M. et al. Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice and concentrate. *Food Technol.*, 10:553-6, 1956.
7. BROKAW, C. H. The role sanitation in quality control frozen citrus concentrates. *Food Technol.*, 6:344-9, 1952.
8. CHRISTOVAO, D. de A. Padrões bacteriológicos. In: Água, qualidade, padrões de potabilidade e poluição. São Paulo, CETESB, 1974. p. 57-119.
9. DACK, G. M. Significance of enteric bacilli in foods. *Amer. J. publ. Hlth*, 45:1151-6, 1955.
10. DECRETO nº 12.342 - 27 de setembro de 1978. São Paulo, Secretaria da Saúde, 1979.
11. FAVILLE, L. W. & HILL, E. C. Incidence and significance of microorganisms in citrus juices. *Food Technol.*, 5:423-5, 1951.
12. FERRARO, F. M. & APPLEMAN, M. D. Microbiology of frozen orange concentrate. IV. Further studies of enterococci in frozen orange concentrate. *Bact. Proc.*, 9:27, 1956.
13. GARCIA apud TANNER, F. W. *Microbiology of foods*. Champaign, Garrard Pres, 1944.
14. GELDREICH, E. E. Fecal coliform concepts in stream pollution. *Wat. Sev. Wks*, 114, 1967. [separata]
15. GELDREICH, E. E. Qualidade microbiológica em águas potáveis. In: Desinfecção de águas. São Paulo, CETESB, 1974. p. 73-93.
16. HAYS, G. L. & RIESTER, D. W. The control of off-odor spoilage in frozen concentrated orange juice. *Food Technol.*, 6:386-9, 1952.
17. HILL, E. C. & FAVILLE, L. W. Studies on the artificial infection of orange with acid-tolerant bacteria. *Proc. Fla. St. hort. Soc.*, Lake Alfred, 64:174-7, 1951.
18. HUCKER, G. J. et al. The source of bacteria in processing and their significance in frozen vegetables. *Food Technol.*, 6:147-55, 1952.
19. HUNTER, A. C. Uses and limitation of the coliform group in sanitary control of food production. *Food Res.*, 4:531-8, 1939.
20. HUTCHISON, D. et al. The incidence and significance of microorganisms antagonistic to *Escherichia coli* in water. *J. Bact.*, 45:29, 1943.
21. LIGLER, I. J. Non-lactose fermenting bacteria from polluted wells and sub-soil. *J. Bact.*, 4:35-42, 1919.
22. LARKIN, E. P. et al. Fecal streptococci in frozen foods. I. A bacteriological survey of some commercially frozen foods. *Appl. Microbiol.*, 3:98-101, 1955.
23. LEITÃO, M. F. de F. et al. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação II — Avaliação do teste para caracterização de coliformes fecais. *Bol. Inst. Tecnol. Alim.*, 4:13-21, 1971/1972.
24. McCABEL, L. J. et al. Survey of community water supply systems. *J. Amer. Water Wks Ass.*, 62:670, 1970.
25. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria nº 410 de 27 de setembro de 1974. *Diário Oficial*, Brasília, 8 out. 1974. Supl. esp., p. 11495.

26. MURDOCK, D. I. et al. Some observations of aum-forming organisms found on fruit surfaces. *Proc. Fla. St. hort. Soc.*, Lake Alfred, 66:278-81, 1953.
27. NOLTE, A. J. & VON LOESECHE, H. W. Types of organism surviving in commercially pasteurized citrus juices in Florida. *Food Res.*, 5:73-81, 1940.
28. PATRICK, R. *Microbiological surveys of citrus processing plants during the 1948-1949 season*. New Orleans, Louisiana. Southern Regional Research Laboratory, 1950.
29. PATRICK, R. Sources of coliform bacteria in citrus juice for concentrates. *Proc. Fla. St. hort. Soc.*, Lake Alfred, 64:178-81, 1951.
30. REITTER, R. & SELIGMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water. *J. appl. Bact.*, 20:45, 1957.
31. RESOLUÇÃO nº 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 25 jul. 1978. Supl. esp., p. 11616.
32. SCHIAVONE, E. L. & PASSERINE, L. M. D. — El genero *Pseudomonas aeruginosa* en la determinacion de la potabilidad del agua de bebida. *Sem. med.*, Buenos Aires, 111:1151-7, 1957.
33. SHARF, J. M. *Exame microbiológico de alimentos*. 2ª ed. São Paulo. Polígono, 1972.
34. THATCHER, F. S. & CLARK, D. S. *Análisis microbiológico de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 1973.
35. WAKSMAN, S. A. Antagonistic relations on microorganisms. *Bact. Rev.*, 5:231-91, 1941.
36. WEAWER, R. H. & BOITER, T. Antibiotic-producing species of *Bacillus* form well water. *Trans. Ky. Acad. Sci.*, Lexington, 13:183, 1952.
37. WOLFORD, E. R. Bacteriological studies of frozen orange juice stored at 10°F. *Food Technol.*, 4:241-5, 1950.
38. WOLFORD, E. R. Certain aspects of the microbiology of frozen concentrated orange juice. *Amer. J. publ. Hlth*, 46:708-15, 1956.
39. WOLFORD, E. R. A source of coliform in frozen concentrated orange juice. Fruit surface contamination. *Appl. Microbiol.*, 4:250-3, 1956.
40. WOLFORD, E. R. & BERRY, J. A. Condition of oranges as affecting bacterial of frozen juices with emphasis on coliform organisms. *Food Res.*, 13:172-8, 1948.

Recebido para publicação em 29/10/1980
Aprovado para publicação em 08/12/1980