

INVESTIGAÇÕES SÔBRE MÉTODOS RÁPIDOS PARA DIFERENCIAÇÃO DOS MICROORGANIS- MOS DO GRUPO COLIFORME.

A. BÜLLER SOUTO

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

MARIA APARECIDA MORENO, MARIA E. C. MACEDO, OLGA PUPO
E ZÉLIA GAMBIER

Técnicas de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

Desde a descoberta da *E. coli* e do *A. aerogenes*, o grupo das bactérias coliformes apresenta o mais profundo interêsse para os bacteriologistas e sanitaristas. Conforme referem Chem e Rettger²: “As theses organisms were first isolated from human intestine, their presence elsewhere has generally been taken as an index of fecal pollution”.

O estudo das bases da identificação e da diferenciação dos germes do grupo coliforme, levou a apreciar o seu comportamento nos diferentes meios de cultivo.

O estudo da fermentação da glicose pelos coliformes conduziu à descoberta de dois fatos importantes: a *E. coli* produz acidez elevada e utilização parcial de glicose, enquanto que o *A. aerogenes* produz acidez baixa e exaustão completa da glicose. Assim o comportamento do *A. aerogenes* em relação à glicose é totalmente diverso do da *E. coli*, ao passo que conforme verificou Thompson⁹, o comportamento do *A. cloacae* sobre a glicose é idêntico ao do *A. aerogenes*. Estudando o comportamento de certo número de bactérias em meios de cultivo ricos de glicose, Voges e Proskauer¹¹, em seus estudos sobre as bactérias da septicemia hemorrágica, descreveram uma reação colorida.

Esta reação foi denominada reação ou prova VP e, desde logo, foi empregada na identificação e diferenciação das bactérias, principalmente na diferenciação das bactérias do grupo coliforme, pois as do gênero *Escherichia* são VP negativas, ao passo que as pertencentes ao gênero *Aerobacter* são VP positivas.

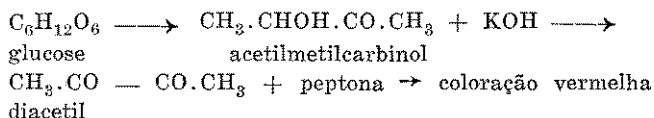
(*) Trabalho apresentado e aprovado pela 1.ª Jornada Brasileira de Bromatologia.

A reação de VP é devida à formação, por certo número de bactérias, de uma substância redutora denominada acetilmetilcarbinol (acetoina).

Segundo verificaram Harden e Norris³ o acetilmetilcarbinol é oxidado pela adição da potassa, em presença da peptona, comunicando ao meio uma coloração semelhante a da eosina.

O acetilmetilcarbinol, $\text{CH}_3\text{.CHOH.CO.CH}_3$, é um produto de oxidação do 2:3 butilenoglicol $\text{CH}_3\text{.CHOH.CHOH.CH}_3$. O carbinol oxidado em presença de álcalis fortes dá origem ao diacetil ($\text{CH}_3\text{.CO}_2$); êste, exposto ao ar e em presença de potassa, reage com a peptona formando um composto com coloração semelhante a da eosina.

A marcha obedecida pela reação de VP seria a seguinte:



A produção do acetilmetilcarbinol e do 2:3 butileno glicol seria devida à condensação do acetaldeído formado. Mais tarde Neuberg e Reinfurth⁵ verificaram que, adicionando acetaldeído a um meio contendo açúcar fermentado por levedura, forma-se a aciloina, por condensação pela união de uma molécula do aldeído adicionado a uma molécula do aldeído produzido pela levedura. Êssa condensação do aldeído e formação do acetilmetilcarbinol, seria devida à ação da levedura sob a influência de uma enzima denominada carboli-gase (Neuberg).

A reação sendo demorada e deixando, por vêzes, dúvidas quanto a sua interpretação, foi motivo de pesquisas a fim de tornar a sua leitura mais rápida. Assim Chen e Rcttger³ sugeriram a agitação, durante certo tempo, das culturas na quantidade de 5 a 6 cm^3 incubadas 5 dias a 37°C, com igual quantidade de solução a 10% de potassa e incubação novamente a 30°C por 1 à 3 horas e nova agitação. Walpole¹² observou que passando uma corrente de ar através da cultura forma-se acetilmetilcarbinol em quantidade 5 ou 6 vêzes maior do que sem o borbulhamento do ar.

Rogers e colaboradores⁸, verificaram que havia uma definida relação entre as bactérias do grupo VP e as da prova do vermelho de metila. As bactérias VP positivas eram sempre negativas sendo também verdadeiro o inverso.

A reação VP foi empregada para identificação da *E. coli* e para a diferenciação dos diferentes coliformes. Conforme referem Chen e Rettger³ a prova VP demonstrou ser muito útil para diferenciar a *E. coli* dos diferentes tipos de *Aerobacter*: "Neither the character of the medium nor the period of incubation seems to interfere with carbinol formation". A oxigenação abundante e a alcalinização forte seriam as condições indispensáveis para que a reação se produzisse.

Quando a incubação se prolonga por um longo período a reação de Voges-Proskauer torna-se negativa. Conforme verificaram Paine⁷ e Williams e Morrow¹⁴ as bactérias destroem o acetilmetilcarbinol. Como esta destruição não é paralela à exaustão da peptona Williams e Morrow¹⁴ concluem que "it seems probable that compound serves as a source of carbon". Tittsler¹⁰ verificou que no meio de Clark Lubs o gênero *Aerobacter* produz reação negativa com 5 dias e positiva com 3 dias, donde a necessidade de não prolongar a incubação além de 3 dias quando se prefere usar o meio de Clark Lubs (aliás, conforme recomenda o Standard Methods of Water Analysis A. Publ. Health Ass. 1933). Como o acetilmetilcarbinol está em relação direta com o "flavour" de numerosos alimentos tais como a manteiga, o pão, o café, o tabaco e a cerveja, Tittsler¹⁰ procurou verificar até que ponto os membros do gênero *Aerobacter* poderiam fermentar o acetilmetilcarbinol, transformando-o em diacetil e alterando portanto os característicos organoléticos daqueles alimentos. Verificou que aproximadamente a metade das amostras de *A. aerogenes* e *A. oxitocum* fermentam esta substância que não é atacada pelas amostras de *A. cloacae* e *A. levans*.

Partindo do princípio que a prova do VP pode ser apressada pela oxidação, Levine, Weldin e Johnson⁴ experimentaram vários oxidantes, com o objetivo de apressar a reação. Empregaram entre outros: o bicromato de potássio, o clorato de potássio, o perclorato de potássio, o peróxido de bário, o hipoclorito de cálcio e o peróxido de hidrogênio, lançando mão da sacarose em lugar da glicose. Com o emprêgo do primeiro conseguiram obter leituras positivas após 15 minutos. Em geral, porém, todos os oxidantes apressam a leitura, tendo o peróxido de hidrogênio dado resultados melhores. E' necessário, porém, juntar o peróxido de hidrogênio após ter misturado a cultura com a potassa e depois de já ter aquecido esta mistura em banho-Maria por 2 minutos. O peróxido de hidrogênio

é adicionado na quantidade de 2 a 3 gotas. A coloração aparece em 1 ou 2 minutos e persiste por várias horas. Um excesso de peróxido de hidrogênio torna a reação muito fugaz. Nos meios glicosados a adição do peróxido não é inteiramente satisfatória, pois, segundo referem Levine e colaboradores⁴: "The difficulty is probably due to the coloration which develops when the glucose — KOH mixture is heated".

Com idêntico objetivo de apressar a leitura do VP foi empregado o peróxido de sódio por Bedford¹; o inconveniente maior no uso desse agente oxidante reside na natureza transitória da coloração, nas culturas positivas.

Procurando evitar êsses inconvenientes Werkmann¹³ empregou o cloreto férrico como catalisador afim de apressar a oxidação do acetilmetilcarbinol em diacetil. Acentua Werkmann¹³ várias vantagens no emprêgo desta substância: a coloração forte aparece na superfície após poucos minutos e se estende para o fundo do tubo, a coloração é estável por vários dias e assim permanece mesmo após uma semana, dando a prova resultados positivos desde os três primeiros dias de incubação a 30°C.

A técnica consistia em juntar 2 gotas de uma solução a 2% de cloreto férrico a 5cm³ da cultura, adicionava-se depois 5cm³ de uma solução de soda a 10% sendo o tubo agitado. A adição do cloreto férrico deve ser feita antes da soda, porque depois forma-se uma floculação marcada. A reação é apressada aquecendo-se a cultura mais o cloreto férrico, sem a soda, durante um minuto em água fervendo.

Tomando em consideração as objeções comumente feitas contra os métodos de diferenciação aconselhados pelo "Standard Methods for Water Analysis" resolveram Lindsey e Meckler⁵, empregar comparativamente o método de Werkmann¹³ em culturas em caldo glicosado de 24 horas a 37°C e o método padrão e verificar se os mesmos coincidiam exatamente.

Tendo em conta, também, as diferenças de potenciais de oxido-redução entre *E. coli* e *A. aerogenes*, Lindsey e Meckler⁵ resolveram igualmente investigar a possibilidade de ser empregado o potencial redox para a diferenciação de coliformes, utilizando a redução dos corantes como indicador. Verificaram assim que pingando uma gota de uma solução aquosa saturada de azul de metileno em uma cultura de 24 horas de *A. aerogenes* em caldo lactosado, o azul de metileno é reduzido em poucos minutos. No caso

da *E. coli* só havia redução após várias horas. Não empregavam meios especiais, utilizando apenas os tubos de fermentação de caldo lactosado usados nas “provas complementares” para o grupo *coli-aerogenes*.

Assim conseguiram diferenciar com a maior facilidade a *E. coli* do *A. aerogenes* em apenas uma hora, sem a necessidade de serem usados meios especiais.

Porém, se em lugar do caldo lactosado empregavam o caldo comum, as culturas de 24 horas da *E. coli* reduziam o azul de metileno rapidamente.

A explicação seria a seguinte: durante o seu crescimento a *E. coli* aumenta a concentração iônica do caldo com açúcar tão rapidamente que o limite de tolerância é prontamente atingido e o crescimento para. Ao passo que o *A. aerogenes* tende a decompor o ácido à medida que o mesmo vai sendo formado e assim o crescimento prossegue por muito mais tempo. No caldo lactosado a *E. coli* não reduz mais o azul de metileno porque o crescimento, após 24 horas é paralisado integralmente e a taxa de crescimento é extremamente lenta. A média de crescimento é o fator principal na determinação dos potenciais de desenvolvimento das culturas.

TÉCNICA

Foi empregada a técnica de Lindsey e Meckler⁵: adicionava-se às culturas de 24 horas em caldo lactosado, uma gota de solução aquosa saturada de azul de metileno e observava-se por várias horas na temperatura ambiente.

O contrôle do VP era feito com a mesma amostra cultivada em caldo com sacarose e de acôrdo com o “Standard Methods of Pure Culture”.

RESULTADO

Foram examinadas 226 amostras sendo;

- 84 de *Aerobacter aerogenes*
- 52 de *Aerobacter cloacae*
- 51 de *E. coli*
- 39 de *E. freundii*

As amostras foram isoladas de produtos diversos.

Dentre as 84 amostras examinadas de *A. aerogenes*, 71 deram resultados positivos com o VP padrão e 13 discordaram, o que representa 18,3% de discordância entre os dois métodos de diagnóstico.

Dentre as 52 amostras de *A. cloacae*: 37 deram resultados positivos, 15 discordaram, o que demonstra uma elevada porcentagem de 40,5% de discordância.

De *E. coli* foram examinadas 51 amostras, havendo 49 concordantes e 2 discordantes ou sejam 4% de discordâncias.

Entre as 39 amostras de *E. freundii* somente uma discordou em 2,63% do total das examinadas.

Conforme se deduz dos resultados acima, a prova de VP comparada com a prova de redução de azul de metileno de Lindsey e Meckler⁵, demonstrou resultados aproximadamente comparáveis só nos germes do grupo *Escherichia*.

CONCLUSÃO:

1 — A diferença de potencial de óxido-redução entre os germes dos gêneros *Escherichia* e *Aerogenes* foi experimentada para a diferenciação rápida desses coliformes.

2 — O indicador usado foi o azul de metileno.

3 — A reação de VP foi tomada como termo de comparação.

4 — O método do azul de metileno apresentou 2,63% de discordância com o VP entre as espécies de *E. freundii*; 4% entre as de *E. coli*; 18,3% entre as de *A. aerogenes* e 40,5% entre as de *A. cloacae*.

5 — O método de diferenciação dos coliformes pelo descoramento do azul de metileno não oferece margem de segurança.

CONCLUSIONS

1st. — The difference in the oxy-reduction potential between germs of the *Escherichia* and *Aeropenes* genera was tried out as a basis for rapid differentiation of these coli-form germs.

2nd. — The indicator used was methylene blue.

3rd. — The V. P. reaction was taken as a means of comparison.

4th. — The methylene blue did not tally with the VP in 2,63% of the species of *E. freundii*, 4% of the *E. coli*, 18,3% of *A. aerogenes*, and 40,5% of the *A. cloacae*.

5th. — The method of differentiation of the coliform germs by the discoloration of the methylene blue is not secure one.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BEDFORD, R. H. — 1929 — A rapid method for obtaining the Voges Proskauer reaction. *Journ. Bact.*, 18: 93.
- 2 — CHEN, C. C. e RETTGER, L. F. — 1920 — A correlation study of colon aerogenes group of bacteria, with special reference to the organisms occurring in soil. *Journ. Bact.*, 5: 253.
- 3 — HARDEN, A. e NORRIS, D. — 1912 — The bacterial production of acetylmethyl carbinol and 2,3-butylene; glycol from various substances. *Proc. Roy. Soc.*, 85: 73.
- 4 — LEVINE, M., WELDIN, J. C. e JOHNSON, B. R. — 1917 — The Voges-Proskauer and correlated reactions of coli-like bacteria. *Journ. Inf. Dis.*, 21: 39.
- 5 — LINDSEY, G. A. e MECKELR, C. M. — 1932 — Two rapid methods for distinguishing between *Escherichia coli* and *Aerobacter aerogenes*. *Journ. Bact.*, 32: 114.
- 6 — NEUBERG, C. e REINFURTH, E. — 1923 — Eine neue form Unwandlung des Acetaldehyde durch gärende Hefe. *Bioch. Zeitschr*, 143: 553.
- 7 — PAINE, F. S. — 1927 — The destruction of acetyl-methylcarbinol by members of the colon-aerogenes group. *Journ. Bact.*, 13: 269.
- 8 — ROGERS, L. A., CLARK, W. M. e LUBS, H. A. — 1918 — The characteristics of bacteria of the colon type occurring in human feces. *Journ. Bact.*, 3: 231.
- 9 — THOMPSON, J. — The chemical action of *B. cloacae* on glucose and manitol.
- 10 — TITSLER, R. P. — 1938 — The fermentation of acetyl-methyl carbinol by the *Escherichia-aerobacter* group and its significance in the Voges-Proskauer reaction. *Journ. Bact.*, 35: 157.
- 11 — VOGES, O. e PROSKAUER, B. — 1898 — Beitrage zur Ernährungs-physiologie und zur differential diagnose der Bacterien der Hemorrhagischen septicaemie. *Zeit. fur Hyg.*, 28: 20.
- 12 — WALPOLE, S. G. — 1910-1911 — The action of *B. lactis aerogenes* on glucose and manitol. *Proc. Roy. Soc.*, 83: 272.
- 14 — WILLIAMS, O. B. e MORROW, H. B. — 1928 — The bacterial destruction of acetyl-metyl-carbinol. *Journ. Bact.*, 16: 43.