

BRUCELAS

Ação sobre nitrato

LÚCIA DE QUEIROZ TELES

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

Não são desconhecidas dos que trabalham em Bacteriologia as controvérsias suscitadas pela prova da redução de nitrato pelas bactérias desde que, a partir das investigações de Maassen¹, em 1902, se tem empregado tal reação para a identificação bacteriana.

Tem variado os meios de cultura usados não só quanto à consistência, mas quanto à qualidade e quantidade dos ingredientes; tem sofrido certa variação os reagentes, qualitativa e quantitativamente; variadas tem sido as proporções entre reagentes e cultura; diferentes também tem sido os períodos de incubação do germe. É natural que, a tal diversidade de condições experimentais, tenham correspondido, conseqüentemente, diferentes resultados.

A maior confusão procede do fato que vamos expor, já considerado por Conn & Breed². A Comissão de Métodos Padrões de Exames de Água, da Saude Pública Americana, no relatório de 1905³ dava as seguintes instruções para o preparo do meio de cultura destinado à prova da redução de nitrato:

“Dissolver 1 gr. de peptona em 1 litro de água e juntar 2 grs. de nitrato de potássio isento de nitrito. É conveniente preparar solução estoque de nitrato de potássio dissolvendo 4 grs. de nitrato em 100 cc. de água destilada e usar 5 cc. desta solução na fórmula acima.”

A solução de nitrato na 1.^a sentença era, pois, a 0,2%; na 2.^a, a 0,02%. O relatório de 1912⁴, tentando corrigir tal discordância, ajustou a 1.^a sentença substituindo 2 grs. por 0,2 grs.. Por um lapso, entretanto, foi a 2.^a sentença também alterada: 4 grs. mudadas para 0,4 grs., dando uma solução a 0,002%. Daí a possibilidade de três diversas interpretações e, em consequência, a variação dos caldos-nitrato “standard” usados pelos diferentes bacte-

riologistas; apesar de descritos como "standard" ñem sempre se correspondem, acarretando, entãõ, resultados desencontrados.

Estabelecidas as razões dos divergentes resultados obtidos quanto à capacidade das bactérias reduzirem nitrato, passemos ao que, a respeito de tal ação redutora, se tem descrito sobre Brucelas. Bastante contraditórias são as publicações. Eyre⁵, Duncan & Whitby⁶ descrevem as Brucelas como não redutoras de nitrato. Para Meyer & Shaw⁷, Lustig & Vernoni⁸, Gay e colaboradores⁹, há ocasional redução. Segundo ZoBell & Meyer¹⁰ todas as amostras examinadas, num total aproximado de 400, reduziam nitrato vigorosamente. Evans¹¹ regista algumas amostras de *Br. abortus* e de *Br. melitensis* levemente redutoras e a maioria de *Br. bronchisepticus* negativa. Bergey¹², em 1930 e 1934, descreve as Brucelas como não redutoras mas, em 1939, diz que a *Br. melitensis* reduz nitrato, muitas vezes com completo desaparecimento de nitrito, acrescentando que, devido ao desaparecimento de nitrito, são aparentemente contraditórios os informes da literatura; *Br. abortus* e *Br. suis*, caracteres idênticos; *Br. bronchisepticus* muitas vezes positiva. Topley & Wilson¹³, em 1929, registam redução ocasional; porem, em 1936, baseando-se no trabalho de ZoBell e Meyer, consideram redutores todos os tipos. Hauduroy¹⁴ cita *Br. abortus* como inativa sobre nitrato e *Br. melitensis* redutora em meio semi-sólido. Em síntese: a confusão parece dissipar-se, aos poucos, após as publicações de ZoBell e Meyer, assentando-se como definitiva a redução de nitrato pelas Brucelas.

Verificando, em 1939, as amostras de Brucela da coleção do Instituto Bacteriológico, hoje Instituto Adolfo Lutz, seguimos as diretrizes do Manual de Métodos da Sociedade de Bacteriologistas Americanos¹⁵, quanto a meio de cultura, reagentes e técnica. Estabelecemos, preliminarmente, que cresciam muito bem em o caldo-nitrato alí recomendado; depois, realizando a prova, observamos que todas acusavam forte redução de nitrato a nitrito em culturas de 24 horas, salvo a *Br. melitensis*. Lembrando-nos da afirmativa de Topley e Wilson, que nitrito é também rapidamente reduzido pelas Brucelas de forma que a sua pesquisa em culturas em caldo-nitrato pode ser negativa, tentamos investigar a redução de nitrato a nitrito em culturas de 8 horas apenas, para os casos negativos acima. Foram, entãõ, todos positivos. Os nossos resultados eram, assim, concordes com os de ZoBell e Meyer no tocante à capacidade de as Brucelas reduzirem nitrato a nitrito; concluíamos, entretanto, não

ser indispensável o emprego do agar semi-sólido por eles recomendado. O caldo-nitrato "standard" da Sociedade de Bacteriologistas Americanos satisfazia plenamente.

Recomeçando, há pouco, as observações feitas naquela ocasião, procuramos acompanhar, de hora em hora, o comportamento das Brucelas relativamente ao nitrato. Interessantes certos pontos notados e que passamos a relatar.

AMOSTRAS ESTUDADAS

Demos preferência a amostras conhecidas, de que no momento dispúnhamos.

Br. abortus procedente de Michigan, Estados-Unidos, Laboratório de Huddleson.

Br. abortus procedente de Buenos-Aires, Laboratório do Ministério de Agricultura.

Br. abortus 26.291, procedente do Instituto Butantã.

Br. abortus 26.131, procedente do Instituto Butantã.

Br. abortus procedente do Departamento de Indústria Animal e isolada por Alexandre Melo.

Br. melitensis 267, procedente da Argentina e isolada por Mazza na província de Catamarca.

Br. melitensis 236, procedente da Argentina e isolada por Mazza na província de Catamarca.

Br. suis procedente de Michigan, Estados-Unidos, Laboratório de Huddleson.

Br. suis procedente do Laboratório do Professor Carini.

TÉCNICA

Meio de cultura: caldo-nitrato recomendado pela Sociedade de Bacteriologistas Americanos.

Reagentes: soluções de ácido sulfanílico e de naftilamina alfa, ali recomendadas.

Proporção entre reagentes e cultura, idem.

Semeadura em diversos tubos, com alça de 2 mms. para que, sendo aproximadamente igual a quantidade de células, pudessem os resultados ser comparáveis. Incubação a 37°C..Pesquisa de nitrato de hora em hora.

Controle: tubos de caldo-nitrato não semeados, conservados em condições idênticas.

RESULTADOS

Por circunstâncias imprevistas precisamos interromper algumas vezes nossas observações, como se vê no quadro adiante. Mesmo assim, os resultados obtidos nos permitem estabelecer como definidos certos pontos:

1 — As *Br. abortus* e *Br. suis* reduziram fortemente nitrato a nitrito.

2 — As *Br. melitensis* deram reações mais fracas.

3 — A redução foi acusada por algumas amostras de Brucelas após 1 hora, apenas, de incubação.

4 — Após 5 horas de incubação todas as amostras revelaram redução.

5 — Até 18 horas os resultados assim se conservaram.

6 — A partir de 18 horas começou, para diversas amostras, o desaparecimento do nitrito formado, mas a prova do zinco revelava, ainda, quantidade mínima de nitrato.

7 — Antes de 48 horas as reações acusando desaparecimento de nitrito (salvo 1 de *Br. melitensis*) já não revelavam presença de nitrato.

8 — Três amostras de *Br. abortus* não mostraram desaparecimento do nitrito até 120 horas.

Os tubos-controle deram reação negativa com os reagentes para nitrito, provando ser o meio usado isento desse composto, e o seu aparecimento nos tubos da reação devido, portanto, à ação redutora do germe sobre o nitrato.

DISCUSSÃO

Quando se investiga a ação redutora bacteriana sobre nitrato, uma reação positiva com os reagentes para nitrito é de fácil conclusão. Trata-se de germe redutor de nitrato a nitrito, desde que se tenha empregado meio de cultura contendo nitrato e isento de nitrito.

A dificuldade consiste na interpretação das reações negativas; não autorizam conclusão imediata de não-redução de nitrato a nitrito.

Em face de reação negativa para nitrito procura-se, pela prova do zinco, evidenciar a presença de nitrato para se inferir se não houve redução ou se ela foi além de nitrito.

Se, ao lado de reação nitrito-negativa, tem-se reação positiva com o zinco provando não ter sido o nitrato reduzido, considera-se não-redutor de nitrato o germe. Certas ressalvas devem ser consideradas, entretanto: há a hipótese aventada por Conn¹⁶, fundamentada em observações pessoais, da perda temporária de capacidade redutora, do germe; há a hipótese de redução parcial de nitrato sem acumulação de nitrito, no caso de o germe ser capaz de reduzir ou consumir pequenas quantidades de nitrito; resta, ainda, a possibilidade de ser o meio de cultura impróprio ao crescimento do germe.

Sendo, ao contrário, negativa a reação do zinco ao lado de reação nitrito-negativa, diversas possibilidades se admitem: produção de hidroxilamina, segundo Lindsey & Rhines¹⁷, assimilação direta do nitrato sem prévia redução, redução do nitrato a nitrito seguida de assimilação deste sem se acumular em quantidades verificáveis, redução do nitrato a nitrito mas conversão rápida em amônia e nitrogênio, enfim uma série de alternativas possíveis.

É certo que tem sido propostos processos para decidirem algumas das dúvidas acima. Passagens sucessivas do germe em meio-nitrato para o caso de incapacidade redutora temporária. Determinação quantitativa do nitrato para a suspeita de redução parcial de nitrato sem acumulação de nitrito. Se o meio é impróprio, aumento de peptona quando o germe exige muita matéria orgânica, substituição por alguma forma inorgânica de nitrogênio em caso oposto, emprego de meio semi-sólido para germe microaerófilo ou agar inclinado para germe absolutamente aeróbio, ajuste da reação, etc.. Oxidação da hidroxilamina com iodo antes de se pesquisar nitrito, quando se suspeita ter sido produzida. No caso de redução de nitrato a nitrito e conversão rápida em amônia, pesquisa da mesma o que só teria valor em meio sintético porque em meio comum ela pode provir da peptona e não do nitrato; prova, portanto, só aplicável a germes que crescem em meio sintético. Há, ainda, o processo de Bronfenbrenner & Schlesinger¹⁸, consistindo no emprego, em conjunto, de meio com nitrato e meio com nitrito.

Apesar de todos estes recursos para eficiência da prova, não podemos deixar de reconhecer que só não traz complicações de técnica e dificuldades de interpretação a reação positiva com reagentes para nitrito. isto é, a do germe que imediatamente se revela redutor de nitrato. Conn e Breed dizem, categoricamente, que nenhum microorganismo pode seguramente ser chamado não-redutor

REDUÇÃO DE NITRATO A NITRITO

Horas	<i>Br. abortus</i> Michigan	<i>Br. abortus</i> B. Aires	<i>Br. abortus</i> 26.291	<i>Br. abortus</i> 26.131	<i>Br. abortus</i> I. Animal	<i>Br. melit.</i> 267	<i>Br. melit.</i> 236	<i>Br. suis</i> Michigan	<i>Br. suis</i> Carini
1	++	+	-	-	-	-	-	-	+
2	+++	++	±	-	-	-	-	±	+
3	++++	+++	+	±	±	-	±	+	++
4	++++	+++	++	+	+	-	±	++	+++
5	++++	+++	++	+++	++	+	+	++++	++++
6	++++	+++	+++	++	++	+	+	+++	++++
7	++++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++
8	++++	+++	+++	++	+++	+	+	+++	++++
9	++++	+++	+++	++	++++	++	+	+++	++++
10	+++	+++	+++	++	++++	+	+	++	++++
11	+++	+++	+++	++	++++	+	+	++	++++
12	+++	+++	+++	++	+++	+	+	++	+++
13	++++	++++	++++	++	+++	+	++	++	++++
14	++++	++++	++++	++	+++	+	++	++	++++
15	++++	++++	++++	++	+	+	++	+	++++
16	++++	++++	++++	++	+++	++	+	++	++++
17	++++	++++	++++	++	+++	++	++	++	++++
18	++++	++++	++++	+++	+	+	+	+	++++
19	++++	++++	++++	+++	nitrito - +	nitrito ± +	nitrito ± +	+	++++
20	++++	++++	++++	+++	nitrito - +	nitrito ± +	nitrito - +	nitrito ± +	++++
21	++++	++++	++++	+++	nitrito - +	nitrito - +	nitrito - +	nitrito ± +	++++
22	+++	++	++++	+++	nitrito - +	+	nitrito ± +	nitrito ± +	+++
23	++++	++++	++++	+++	nitrito - +	nitrito ± +	nitrito - +	nitrito - +	+++
24	+++	++	++++	+	nitrito ± +	nitrito - +	nitrito - +	nitrito - +	+++
25	++++	+	++++	+	nitrito - +	nitrito - +	nitrito - +	nitrito - +	++++
26	++++	++++	++++	++++	nitrito ± +	nitrito - +	nitrito - +	nitrito - +	++++
27	++++	++++	++++	++++	+	nitrito - +	nitrito - +	nitrito - +	++++
INTERRUPÇÃO									
43	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito - +	nitrito - +	nitrito -	nitrito -
44	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito - +	nitrito - +	nitrito -	nitrito -
45	+++	+++	+++	nitrito -	nitrito -	nitrito - +	nitrito - +	nitrito -	nitrito -
46	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito - +	nitrito - +	nitrito -	nitrito -
47	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito - +	nitrito -	nitrito -	nitrito -
48	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito - +	nitrito -	nitrito -	nitrito -
INTERRUPÇÃO									
91	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -
92	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -
INTERRUPÇÃO									
120	++++	++++	++++	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -	nitrito -

O número de cruzeiros indica a intensidade da reação.

± resultado duvidoso.

Nitrato + ou - indica presença ou ausência de nitrato evidenciada pelo zinco adicionado às reações nitrito-negativas.

de nitrato, exceto após exaustivas provas exigindo tempo demais para serem praticadas nas investigações bacteriológicas de rotina.

Parece-nos que se previniriam, em parte, tais inconvenientes, se fosse evitada a ocorrência das reações nitrito-negativas que, verificadas em prazo mais curto, teriam sido positivas. Pesquisa de nitrito, portanto, não em prova única em culturas de 24 e 48 horas e até de 5 dias, como se lê em muitos autores, mas em provas intercaladas com intervalos de poucas horas, a partir de algumas horas após a sementeira.

A Sociedade de Bacteriologistas Americanos já recomendou quatro determinações: após 1, 2, 4 e 7 dias. Julgamos, aliás, conveniente a verificação antes de 24 horas, conforme dissemos acima, em razão das observações que fizemos pesquisando nitrito, de hora em hora, em culturas de Brucelas em caldo-nitrato. Queremos justificá-la comentando o que observamos, conforme resumo atrás, sob o título RESULTADOS.

Primeiramente, concordaram as nossas observações com as de ZoBell e Meyer quanto à decidida capacidade redutora de nitrato a nitrito, das Brucelas.

Concordaram, também, quanto ao desaparecimento de nitrito, por eles considerado como redução; não averiguamos se corria por conta de assimilação ou de redução.

Quanto ao emprego do meio semi-sólido que propuseram como processo "standard" para a prova da redução de nitrato pelas Brucelas, devemos evidenciar que se prestou perfeitamente à nossa prova o caldo-nitrato recomendado pela Sociedade de Bacteriologistas Americanos.

É rápida a redução de nitrato a nitrito, pelas Brucelas, como indicam os resultados positivos para algumas amostras, após 1 hora, apenas, de incubação e, para todas, após 5 horas. De 5 até 18 horas todas as reações conservaram-se positivas pelas provas feitas de hora em hora, isto é, acusaram presença de nitrito. A partir daí começaram diversas a não mais revelar este composto. Vê-se, então, a vantagem em se efetuar a prova com menos horas de incubação do que se costuma. ZoBell¹⁹, por exemplo, diz que a *Br. suis* destrói o nitrito quando formado e que só em intervalos irregulares a sua concentração é suficientemente alta para dar prova positiva, mesmo com reagentes sensíveis. Entretanto, parece-nos que a determinação em prazo mais curto nos permitiu precisar mais exatamente o que se passa: nossas reações com *Br. suis*

acusaram redução do nitrato a nitrito a partir da 1.^a ou 2.^a hora de incubação, *sem desaparecimento do nitrito durante as primeiras 18 horas*. Só então uma das amostras começou a dar reação duvidosa e, finalmente, negativa em 23 horas; a outra deve ter sido negativa ao fim de 36 horas, aproximadamente, a julgar-se pelos resultados de 27 e de 43 horas.

Verificamos, também, que as reações não mais revelando presença de nitrito após 18 horas, acusavam, ainda, nitrato, pela prova do zinco, durante muitas horas, em quantidade mínima, conforme o evidenciava a intensidade fraquíssima da reação. Mais tarde, já não revelavam nitrito nem nitrato. Tal fato sugere que a mínima porção de nitrato ainda existente era assimilada diretamente, sem redução, ou que o nitrito formado não se acumulava em quantidades verificáveis, quer fosse assimilado, quer reduzido. Somente provas suplementares, muitas vezes complicadas, poderiam dar a tais reações interpretação exata. Delas se prescindiria fazendo-se as determinações propostas, isto é, em mais curto prazo, quando nitrito ainda presente.

Outro ponto relatamos: ZoBell e Meyer mencionam redução de nitrato a nitrito, mais forte para a *Br. abortus* do que para a *Br. melitensis*, justificando-a como sendo a última espécie mais ativa redutora do nitrito formado. Também as nossas reações foram, indiscutivelmente, mais fracas com as *Br. melitensis* do que com as *Br. abortus* e *Br. suis*. Contudo, notamos que, quando as demais Brucelas já não acusavam nitrito nem nitrato, as *Br. melitensis* não acusavam nitrito porém não haviam, ainda, esgotado a fonte de nitrato. Esta observação permite admitir-se a *Br. melitensis* como menos intensa redutora de nitrato do que a *Br. abortus* e a *Br. suis*, mas não autoriza considerá-la mais ativa redutora de nitrito.

Ainda uma chamada: Três amostras de *Br. abortus*, entre as 5 experimentadas, conservaram-se positivas até 5 dias de observação, isto é, não acusaram desaparecimento do nitrito formado. Não nos foi possível continuar a observação. Seriam de ação redutora de nitrito nula ou lenta, ou teria o fato relação com o efeito tóxico de altas concentrações de nitrito sobre a *Br. abortus*, referido por ZoBell e Meyer? Não é impossível a última hipótese, porquanto se trata exatamente das amostras que apresentaram reações mais fortes de redução de nitrato. Talvez tenham sido posteriormente impedidas pelo nitrito acumulado.

CONCLUSÕES

1 — *Br. abortus*, *Br. melitensis* e *Br. suis* reduzem nitrato a nitrito em o caldo-nitrato recomendado pela Sociedade de Bacteriologistas Americanos.

2 — *Br. abortus* e *Br. suis* dão reações fortes de redução de nitrato; *Br. melitensis*, fracas.

3 — A redução do nitrato a nitrito pelas Brucelas é rápida, tendo se manifestado, para algumas amostras, após 1 hora de incubação e, para todas, após 5 horas.

4 — Há desaparecimento do nitrito formado a partir, em diversos casos, de 18 horas. Contudo, três amostras de *Br. abortus* reduzindo fortemente nitrato a nitrito, não acusaram desaparecimento posterior de nitrito, durante 5 dias de observação.

5 — Considerando as complicações de técnica e dificuldades de interpretação de resultados decorrentes das reações nitrito-negativas dos germes, em meio com nitrato; considerando, ainda, que muitas dessas reações seriam positivas se verificadas em mais curto prazo, propõe-se, para germes que crescem bem em o caldo-nitrato acima referido, a verificação da redução de nitrato diversas vezes, com intervalos de poucas horas, a partir de algumas horas após a semeadura.

RESUMO

Estudando a A. amostras de *Br. abortus*, *Br. melitensis* e *Br. suis*, relativamente à sua ação sobre nitrato, conclue que todas reduzem, rapidamente, nitrato a nitrito em o caldo-nitrato recomendado pela Sociedade de Bacteriologistas Americanos. Observou redução após 1 hora de incubação para algumas amostras e, para todas, após 5 horas.

Verifica que as *Br. abortus* e *Br. suis* dão reações fortes de redução de nitrato a nitrito que, ao contrário, são fracas com as *Br. melitensis*.

Verifica, também, que há desaparecimento do nitrito formado, a partir, para diversos casos, de 18 horas, o que não se deu, entretanto, durante 5 dias de observação, com três amostras de *Br. abortus* fortemente redutoras de nitrato a nitrito.

Considerando as complicações de técnica e dificuldades de interpretação de resultados decorrentes das reações nitrito-negativas dos germes, em meio com nitrato; considerando, ainda, que muitas dessas reações seriam positivas se verificadas em mais curto

prazo, propõe, para germes que crescem bem em o caldo-nitrato acima referido, a pesquisa de nitrito em provas repetidas, com intervalos de poucas horas, a partir de algumas horas após a sementeira.

SUMMARY

A number of strains of *Br. abortus*, *Br. melitensis* and *Br. suis* has been tested concerning the nitrate reduction.

According to the author, nitrate is rapidly reduced to nitrite by all of them when tested in the nitrate-broth recommended by the Society of American Bacteriologists. Reduction has been noted after one hour's incubation with some strains, but after five hours' incubation they all showed reduction.

The reactions given by the abortus and suis types are much stronger than by the melitensis strains.

Further analyses show that the nitrite disappears; this begins after 18 hours' incubation with some strains. However, three strains of *Br. abortus*, which reduced vigorously nitrate to nitrite, did not exhibit disappearance of nitrite under identical conditions, for the five days during which they were under observation.

Because of the complicated technic and the difficulty in interpreting results when the nitrite reaction given by the microorganism in a medium with nitrate is negative; also, because many of these reactions would be positive if they were verified earlier, the following is suggested by the author. If the microorganism grows well in the above-mentioned nitrate-broth, testing for nitrite would begin some hours after the inoculation. Furthermore several tests would be made, at intervals of some hours.

REFERÊNCIAS

- 1 — MAASSEN, A. — 1902 — *Arb. a. d. kaiserlichen Gsndhtsamte*, 18, 20.
- 2 — CONN, H. J. & BREED, R. S. — 1919 — *Jour. Bact.*, 4, 267-290.
- 3 — AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — 1905 — Cit. em Conn. H. J. e Breed, R. S. — 1919 — *Jour. Bact.*, 4, 267-290.
- 4 — AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — 1912 — "Standard Methods for the Examination of Water and Sewage", 2a. ed., 135.
- 5 — EYRE, J. W. H. — 1912 — "Handb. d. path. Mikroorg.", Kolle, W. e Wassermann, A., 4, 423.
- 6 — DUNCAN, J. T. & WHITBY, L. E. H. — 1930 — "A System of Bacteriology", Medical Research Council, 5, 397.

- 7 — MEYER, K. F. & SHAW, E. B. — 1920 — *Jour. Inf. Dis.*, 27, 173-184.
- 8 — LUSTIG, A. P. & VERNONI, G. — 1928 — “Handb. d. path. Mikroorg.”, Kolle, W. e Wassermann, A., 4, 520.
- 9 — GAY, F. P. & COLABORADORES — 1935 — “Agents of Disease and Host Resistance”, 712.
- 10 — ZOBELL, C. E. & MEYER, K. F. — 1932 — *Jour. Inf. Dis.*, 51, 99-108.
- 11 — EVANS, A. C. — 1918 — *Jour. Inf. Dis.*, 22, 580-593.
- 12 — BERGEY, D. H. — 1930 — “Manual of Determinative Bacteriology”, 3.a ed., 366; 1934 — 4.a ed., 398; 1939 — 5.^a ed., 302.
- 13 — TOPLEY, W. W. C. & WILSON, G. S. — 1932 — “The Principles of Bacteriology and Immunity”, 1, 513; 1936 — 2.a ed., 639.
- 14 — HAUDUROY, P. — 1937 — “Dictionnaire des Bactéries Pathogènes”, 84.
- 15 — SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS — 1936 — “Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria”, v₃₄ 16.
- 16 — CONN, H. J. — 1936 — *Jour. Bact.*, 31, 225-233.
- 17 — LINDSEY, G. A. & RHINES, C. M. — 1932 — *Jour. Bact.*, 24, 489-492.
- 18 — BRONFENBRENNER, J. & SCHLESINGER, M. J. — 1920 — *Abstracts of Bacteriology*, 4, 2-3.
- 19 — ZOBELL, C. E. — 1932 — *Jour. Bact.*, 24, 273-281.