ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O MEIO DE LEVINE E VAUGHN E UM NOVO MEIO, ISENTO DE PEPTONA, PARA DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H_2S PELAS BACTÉRIAS.

ETTORE RUGAI

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

A capacidade sulfidrígena [1] das bactérias é constatação feita, propavelmente, por Gayon em 1877, segundo a citação de Vaughn e Levine.

Petri e Maassen em 1893 afirmam que em meios apropriados todos os germes produzem H_2S. Consideram, por isso, indispensavel especificar o meio empregado, quando a prova é feita para diferenciação de germes. Hunter e Crecelius chegam a resultados semelhantes e concluem tambem que a reação tem valor diferencial quando se indica qual o método empregado.

Pacheco e Costa, em recente publicação, afirmam que a produção de H_2S é propriedade geral das bactérias. Concluem o trabalho dizendo: "A distinção entre bactérias produtoras e não produtoras de H_2S fica assim destituida de importância, uma vez que é uma propriedade geral das bactérias. Resta somente a questão da quantidade que poderá ter certo valor sistemático no computo das propriedades bioquímicas bacterianas".

A procedência da peptona, a importância de substâncias sulfuradas orgânicas ou inorgânicas, com enxofre em grau maior ou menor de oxidação, e, o reativo revelador de H_2S, tem sido o principal motivo dos trabalhos publicados no assunto.

Quanto à peptona, reina desacordo entre os autores.

Myers obteve maior produção com a peptona de Witte e Fairchild do que com a peptona Difco. Thompson conseguiu resultados

---

1 Termo proposto por Pacheco e Costa para exprimir a propriedade que possuem as bactérias de produzir H_2S.

Recebido para publicação em 18 de Outubro de 1941.

opostos. É preciso notar, porem, que aquele trabalhou com meio líquido e papel-acetato de chumbo e, este, com meio sólido e reativo incorporado. Hunter e Crecelius afirmam que não só a procedência tem influência, mas, ainda, as diferentes partidas da mesma marca.

Almy e James, comparando 5 peptonas de origem diferente, estabelecem as seguintes proporções: 1-7-15-19-24. Zobell e Felthman preferem a bacto-triptona pela uniformidade dos resultados. Carvalho Lima e Queiroz Teles, estudando a produção de H_2S pela *Shigella ambigua*, usaram a peptona de Witte, Difco e P. Davis. Concluiram que esta última favorece a produção de H_2S.

Rubner apontou em 1893 a cistina como importante precursor de H_2S e os sulfatos como não reduzíveis. Sasaki e Otsuda, Bürger, Tanner, Wohlgemut, Vaughn e Levine, Almy e James obtiveram resultados idênticos e verificaram ainda a irredutibilidade da taurina.

Tilley estabeleceu a seguinte classificação para o enxofre dos compostos sulfurados:

1.º) Enxofre não oxidado. É aquele que se desprende sob a forma de H_2S quando se aquece o composto com alcalis — cistina, cisteina, etc..

2.) Enxofre parcialmente oxidado. É aquele que se desprende sob a forma de SO_2 quando se aquece o composto com H_3PO_4 — sulfitos, hipo-sulfitos.

3.º) Enxofre oxidado. É o enxofre dos sulfatos e compostos semelhantes.

Nas bases desta classificação, Tilley estudou 6 peptonas e chegou à conclusão que a quantidade de H_2S é proporcional ao enxofre não oxidado e parcialmente oxidado, o que não acontece com o enxofre oxidado.

Atendendo à irregularidade da reação com as diversas peptonas, Kahn propõe que se ajunte ao meio o tiossulfato de sódio para assegurar resultados uniformes. Hunter e Crecelius, Wilson, propõem, com a mesma finalidade, o sulfito de sódio.

A influência dos carbohidratos foi estudada por Seiffert trabalhando com salmonelas. A sacarose (0,5%) favoreceu a produção de H_2S. Em menor grau a levulose e a galatose. Em presença de glicose não houve produção de H_2S. A lactose pouco influiu. Heap e Cadness obtiveram reações mais precoces com o *B. aertrycke*, em presença de glicose. Myers nega o valor da glicose e da lactose como ativadores.

Vaughn e Levine salientam que a porcentagem do agar é importante. Trabalhando com o grupo coli-aerógenes em meio de Levine e Vaughn constataram que a especificidade diminue à medida que se diminue a porcentagem do agar.

Como reativo do H_2S foi inicialmente usado o papel-acetato de chumbo. Sem dúvida o mais sensivel pela não interferência do metal com o crescimento dos germes, e, da matéria orgânica, na combinação entre H_2S formando, e o reativo. É util quando se trata de germes delicados ou quando o meio de cultura é muito colorido. Entretanto, pela grande sensibilidade — dez vezes mais sensivel do que os métodos com indicador incorporado, segundo Zobell e Felthmann — torna, às vezes, o método pouco diferencial.

Com Orlowski, em 1895, têm início os métodos de pesquisa do H_2S com reativo incorporado ao meio de cultura. Com agar-acetato de chumbo ou tartrato de ferro o autor diferenciou o bacilo tífico do bacilo coli.

Sacquépée, em 1905, com os mesmos reativos incorporados à gelatina, estabeleceu a diferenciação entre o B. coli, B. tífico, B. paratífico A e B. Usou, tambem, com menor sucesso, o sulfato de niquel.

O chumbo mereceu mais atenção durante os primeiros 30 anos. É recomendado por Kliger, Thompson, Bailey e Lacy, Grosso, Levy e Valery-Radot, Tribondeau, Morishima, Tilley, Kahn, e Conn.

Kliger propoz o uso combinado do meio de Russel com o acetato de chumbo, substituindo o litmus pelo indicador Andrade, com o fim de observar ao mesmo tempo a fermentação e produção de H_2S pelo grupo tifo-paratifo-disentérico.

O ferro, já usado por Orlowski, é recomendado por Wilson, Schunck, Levine e colaboradores, Zobell e Felthmann. Titslle considera a reação com o ferro de interpretação mais facil do que com o chumbo.

Darling, Pacheco e Melo, Pacheco e Costa, Hunter e Crecelius, dão preferência ao bismuto. Este último constatou que o bismuto é sensivel tanto em meio ácido como alcalino e que o ferro perde a sensibilidade em meio ácido.

William e colaboradores, considerando que o ferro precipita com facilidade e que o chumbo e o bismuto são tóxicos, preferem o cobalto e o niquel. O cobalto é mais sensivel, porem o niquel dá reação mais nítida e por isso usam os dois metais juntos.

Certamente, condições diversas de técnica e a influência da espécie bacteriana, conduzem a resultados diferentes.

A divergência dos autores, principalmente quanto à peptona e indicador, mostra, por si só, a necessidade de se estabelecer um meio "standard" para que os resultados sejam equivalentes.

Pacheco e Costa destituem de valor a distinção entre bactérias produtoras e não produtoras de H_2S. Discordamos desses autores. Estamos com Petri e Maassen, Hunter e Crecelius, que concluem: em meios apropriados todos os germes produzem H_2S, mas, a reação não perde seu valor diferencial desde que se mencione o método usado.

Assim considerando, apresentamos um novo meio, isento de peptona, como auxiliar na diferenciação entre algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*.

MEIO DE CULTURA

CONSTITUINTES

I —	Soro de boi	100 cc.
	Água distilada	30 cc.
II —	Fosfato mono-potássico	0,50 g.
	Cloreto de sódio	7,50 "
	Cloreto de cálcio	0,05 "
	Cloreto de potássio	0,10 "
	Citrato de ferro amoniacal ..... (palhetas vermelhas)	0,40 "
	Água distilada	1000,00 cc.

TÉCNICA DE PREPARAÇÃO

a) Misturar o soro com a água. Ajustar ao pH 7.4. Distribuir 3 a 4 cc. em tubos de 120mm. x 12mm.. Coagular inclinado seguindo a mesma técnica da preparação do soro coagulado de Loeffler.

b) Dissolver os sais da fórmula II nos 1.000 cc. de água. Ajustar ao pH 7.4. Filtrar. Distribuir em balões de 250 cc.. Esterilizar 20 minutos a 110°C..

c) Em cada tubo com o soro coagulado, distribuir 2 a 3 cc. da fórmula II de maneira que parte do soro fique descoberto.

d) Incubar para controlar a esterilidade.

Aconselhamos usar mistura de soro proveniente de vários animais, porque tivemos uma partida de meio cujo resultado não foi satisfatório o que só pudemos atribuir ao soro.

O estudo do comportamento deste meio foi feito comparativamente com o meio proposto por Levine e Vaughn (1932).

Trabalhamos com germes dos gêneros: *Salmonella, Proteus, Eberthella, Escherichia, Aerogenes* e *Shigella.*

O quadro abaixo expressa os resultados.

ESPÉCIE	N de amostras	Meio de Levine e Vaughn			Meio em estudo			Concordância entre os 2 meios
		Resultado			Resultado			
		+	−	% +	+	−	% +	
S. schottmuelleri	31	31	0	100 %	31	0	100 %	100 %
S. paratyphi	30	0	30	0 %	0	30	0 %	100 %
S. ententidis	9	9	0	100 %	9	0	100 %	100 %
S. suipestifer	6	5	0	100 %	5	0	100 %	100 %
Salmonellas sp. vários tipos H_2S + segundo Man. Bergey	12	12	0	100 %	12	0	100 %	100 %
S. abortusovis	1	1	0	100 %	1	0	100 %	100 %
E. coli isol. de água	80	0	80	0 %	0	80	0 %	100 %
F. coli isol. de fezes hum. .	150	0	150	0 %	0	150	0 %	100 %
E. coli isol. de gânglios mesentéricos de porco . .	50	0	50	0 %	0	50	0 %	100 %
E. freundii isol. de água . .	55	41	14	75,5 %	41	14	75,5 %	100 %
A. aerogenes isol. de água	38	0	38	0 %	0	38	0 %	100 %
A. cloacae isol. de água . .	26	0	26	0 %	0	26	0 %	100 %
E. typhosa	40	40	0	100 %	40	0	100 %	100 %
P. vulgaris	4	4	0	100 %	4	0	100 %	100 %
P. americanus	15	15	0	100 %	15	0	100 %	100 %

Houve concordância em 100% dos casos entre o meio de Levine e Vaughn e o meio que estudamos. Com a *E. freundii* tivemos 75,5% das reações positivas (em ambos os meios), o que está em desacordo com Levine e Vaughn que obtiveram 100% de reações positivas com 43 amostras de germes "Intermediários" do grupo coli-aerógenes. Porem em trabalho posterior Vaughn e Levine estudaram 169 amostras de "Intermediários" obtendo só 74% de reações positivas.

A reação de H_2S não pode, pois, competir com a prova do citrato (meio de Koser e meio de Simon) para diferenciar a *E. coli* da *E. freundii.*

A reação com o meio que descrevemos é nítida e de facil interpretação. Processa-se em menos de 24 horas com as *salmonellas, proteus* e *E. freundii.* Com o b. tífico a reação é positiva somente em 48 horas.

RESUMO

O A. descreve um meio para prova de H_2S à base de soro de boi e com citrato de ferro amoniacal como indicador.

O meio não contem peptona, cujo valor na produção de H_2S varia com a origem.

Em estudos comparativos com o meio de Levine e Vaughn (1932) houve concordância em 100% dos casos. Foram empregadas 90 amostras de *salmonellas,* 40 de *E. thyphosa,* 36 de *S. ambigua,* 19 de *proteus,* 280 de *E. coli,* 55 de *E. freundii,* 38 de *A. aerogenes* e 26 de *A. cloacae.*

ABSTRACT

In the present paper the A. describes a new medium as a test for H_2S, production by bacteria using beef-serum as base, and ammonio-citrate iron as indicator.

The medium does not contain peptone the value of which varies in production of H_2S according to its origin.

In comparative studies with the medium of Levine and Vaughn (1932) the A. observed that the results agreed in 100% of the cases. There were tested 90 strains of *Salmonellas,* 40 of *E. typhosa,* 36 of *S. ambigua,* 19 of *Proteus,* 280 of *E. coli,* 55 of *E. freundii,* 38 of *A. aerogenes* and 26 of *A. cloacae.*

BIBLIOGRAFIA

ALMY, L. H. e JAMES, L. H. — 1926 — *Jour. Bact.,* 12, 319.

BAILEY, S. F. e LACY, G. R. — 1927 — *Jour. Bact.,* 13, 183.

BÜRGER, M. — 1914 — Arch. für Hyg. und Bakt. 82, 201 (cit. por Wilson).

BURNET, Et. e WEISSENBACH, R. J. — 1915 — *C. R. Soc. Biol.,* 68, 565.

CARVALHO LIMA e QUEIROZ TELES — 1940, *Ann. Paul. Med. e Cir.* 39, 9.

CONN, H. J. — 1922 — *Jour. Bact.*, 7, 5.

Commitee on Bacteriological Technic Soc. Amer. Bact. — Methods of pure Culture Study — 1923 — A. 32.

DARLING, S. T. — 1913 — *Am. Jour. Publ. Health*, vol. III, n.º 3 (citado por Carvalho Lima e Queiroz Teles).

GAYON, M. V. — 1877 — *C. R. Sci.*, 85, 1074.

GROSSO, G. — 1917 — *Pathologica*, 9, 183.

HAWK, P. B. — 1918 — Practical Physiological chemistry, 6.ª Ed. (citado por Tilley).

HEAP, H. e CADNESS, B. H. E. — 1924-25 — *Jour. Hyg.*, 23, 77.

HUNTER, C. A. e CRECELIUS, H. C. — 1938 — *Jour. Bact.*, 35, 185.

JORDAN, E. O. e VICTORSON, R. — 1917 — *J. Inf. Dis.*, 20, 457.

KAHN, M. C. — 1925 — *Jour. of Bact.*, 10, 439.

KLIGLER, I. J. — 1918 — *Jour. Exp. Med.*, 28, 319.

KLIGLER, I. J. — 1917 — *Am. J. Publ. Health*, 7, 1042.

KHOMENKO, I. A. — 1941 — Ref. no *Chemical Abstracts*, 35, 1082.

LEVINE, M. e outros — 1934 — *Am. J. Publ. Health*, 24, 505.

LEVINE, M. e outros — 1932 — *Proc. Soc. Biol. and Med.*, 29, 1022.

LEVY, Pierre-Paul e PASTEUR VALERY, Radot — 1915 — *Presse Med.*, 51, 420.

MORISHIMA, Kau-Ishico — 1918 — *Jour. Bact.*, III, 19.

MEYRS, J. T. — 1920 — *Jour. Bact.*, 5, 231.

NENKI — 1910 — Monat. für Chem., 9 (apud. Kruse-Allg. Mikr. Leipsig 1919) (citado por Pacheco e Costa).

ORLOWSKI — 1895 — *Jour. Med. Milit. Russe, After Jahresber. Path. Michoörgan.*, 11, 528.

PACHECO, G. e COSTA, G. A. — 1940 — *Mem. Inst. Osvaldo Cruz*, 35, 311.

PACHECO, G. e COSTA, G. A. — 1940 — *Mem. Inst. Osvaldo Cruz*, 35, 381.

PACHECO, G. e MELO, T. — 1932 — *An. Fac. Med. S. Paulo*, 8, 93.

PATRICK, R. e WERKMAN, C. H. — 1933 — *Iowa State College Jour. Sci*, 7, 404 (citado por Vaghn e Levine).

PETRI, R. J. e MAASSEN, A. — 1894 — *Zentralblat*, 15, 908, ref.

PETRI, R. J. e MAASSEN, A. — 1894 — *Zentralblat*, 15, 906.

PULLAR, E. e MURRAY, — 1936 — *J. Path. and Bact.*, 42, 513.

REDFIELD — Tese de dotouramento, citado por Myers.

RUBNER, M. — 1893 — *Zentralblat. f. Bakt.*, 14, 64, ref.

SACQUEPÉE e CHEVREL — 1905 — *C. R. Soc. Biol.*, 59, 535.

SEIFFERT, O. — 1909 — *Zeit. für Hyg. u. Infektionskrankheit.*, 63, 273. (citado por Heap e Cadness).

SASAKI, T. e OTSUDA, I. — 1912 — *Bioch. Zeit.*, 39, 208.

SCHARDINGER, R. — 1894 — *Zentralblat. f. Bakt.*, 16, 853, Orig.

Society of Amer. Bact. Manual of Methods for Pure Culture os Bacteria — 1936.

SCHUMK, I. V. e J. Elisa MITCHELL — 1924 — Sci. Soc., 40, 107 (citado por Carvalho Lima e Queiroz Teles).

SPRAY — 1936 — *Jour. Bact.*, 32, 135.

TILLEY, F. W. — 1923 — *Jour. Bact.*, 8, 115.

TILLEY, F. W. — 1923 — *Jour. Bact.*, 8, 287.

TANNER, F. W. — 1917 — *Jour. Bact.*, 2, 585.

THOMPSON, L. S. — 1921 — *Jour. Med. Res.*, 42, 383.

TISTSLLER, R. P. e SANDHOEZER — 1937 — *Am. Jour. Publ. Health*, 27, 1240.

TRIBONDEAU, L. C. — 1918 — *C. R. Soc. Biol.*, 81, 524.

VAUGHN, R. e LEVINE, M. J. — 1936 — *Jour. Bact.*, 32, 65.

WILLIAM, P. e outros — VTDJ — *Jour. Bact.*, 40, 448.

WILSON, ffi. J. — 1923 — *Jour. Hyg.*, 21, 392.

WOHLGEMUTH, J. — 1... — *J. Zeit. f. Phys. Chem.*, 43, 641 (citado por Pacheco e Costa).

ZOBELL, C. E. e MEYERS, K. F. — 1932 — *Jour. Inf. Dis.*, 51, 91.

ZOBELL, C. E. e FELTHMAN, C. B. — 1934 — *Jour. Bact.*, 28, 169.