

# Produção de H<sup>2</sup>S pelos Clostrídios anaeróbios \*

por

Genesio Pacheco e Gobert Araujo Costa

Ainda é imperfeito o conhecimento da capacidade sulfurígena dos clostrídios anaeróbios. Apesar de Spray achar provável que todos eles sejam produtores de H<sup>2</sup>S, na especificação final das espécies estudadas no seu trabalho de revisão refere o *Clostridium histolyticum*, *Cl. multi-fermentans*, *Cl. butyricum*, *Cl. septicum*, *Cl. botulinum* tipo C. e o *Cl. tetanomorphum* entre os não produtores de hidrogênio sulfurado. Nos trabalhos de Zeissler e de Weinberg não é referida individualmente a capacidade sulfurígena dessas bactérias e em outros trabalhos é ella inteiramente desprezada na especificação (Bergey *ed al*). Por outro lado não ha uniformidade quanto a esta propriedade dos anaeróbios. Topley & Wilson incluem o *Cl. tetani* como não sulfurígeno enquanto que Spray o include no grupo dos produtores de H<sup>2</sup>S.

Naturalmente tem contribuido para imperfeição do conhecimento dessa propriedade dos clostrídios anaeróbios a fraca sensibilidade dos indicadores da presença de H<sup>2</sup>S até então usados na sua pesquisa.

Tendo proposto o bismuto como indicador da presença desse gaz e tendo verificado suas vantagens sobre os outros meios de emprego corrente até agora, tentamos experimental-o na pesquisa da produção de H<sup>2</sup>S pelos clostrídios anaeróbios.

Verificamos, desde logo, que embora revelando produção de hidrogênio sulfurado com a quasi totalidade das amostras de anaeróbios submetidos a provas, o escurecimento era por vezes muito discreto para permitir assegurar franca produção de gaz sulfídrico por parte da bactéria. Aliás já observáramos o mesmo em trabalho anterior com duas espécies de brucelas, uma amostra de *melitensis* e outra de *paramelitensis*, numa série de bactérias experimentadas.

Convencemo-nos, por isso, da necessidade de melhorar a sensibilidade do meio anteriormente proposto para pesquisa da capacidade sulfurígena em relação aos anaeróbios.

As vantagens conhecidas do emprego do figado ou produtos deri-

---

\* Recebido para publicação a 23 de Fevereiro de 1940 e dado á publicidade em Julho de 1940.

vados dele no crescimento de bacterias anaerobias foram assinaladas desde Tarozzi, e a ação favoravel da cistina na produção de H<sup>2</sup>S foi evidenciada por Tylley.

A associação das duas substancias deveria, por conseguinte, aumentar a produção de H<sup>2</sup>S desprendido pelos clostridios na clivagem da cistina, substancia rica de enxofre, decorrente do aumento da vegetação bacteriana.

Partindo desta hipótese preparamos um meio basico contendo:

Peptona Witte	1,5
Cloreto de sodio	0,25
Agar	0,15
Cistina	0,005
Agua a completar	50 cc.

A este meio juntamos quantidades variaveis de extrato de figado-baço: papa de figado e baço, desembaraçados das capsulas e aponevroses, misturada a volume duplo de agua. Aquecer a b. m. fervente durante 1 hora para destruir as propriedades antitripticas. Esfriar. Alcalinizar pela adição de NaOH n/10. Juntar extrato pancreatico, segundo Cole & Onslow, e mais cloroformio. Deixar a 37°, agitando 2-3 vezes até prova de triptofana positiva. Aquecer á fervura, neutralisar, filtrar, distribuir, esterilisar a 115°.

Depois de preparado o meio adicionar carbonato de bismuto a 0,5%. Distribuir em tubos, camada alta. Esterilisar. Agitar os tubos ao sair do autoclave, no momento de resfriamento e gelificação, para distribuição uniforme do indicador na massa do meio.

Numa série de partidas desse meio adicionamos 25, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,5 cc., respectivamente, de extrato de figado-baço, designando-os I, II... VI. Dois outros meios serviram de contraprovas, um sem extrato de figado-baço, correspondendo ao meio primitivo utilizado em trabalho anterior (VII), e outro identico a este, mas desprovido de peptona (VIII). A quantidade de agar foi reduzida a 0,3% para dar ao meio uma consistencia mais mole para favorecer a produção de H<sup>2</sup>S (Vaughan & Levine).

Os resultados da influencia do extrato de figado-baço em comparação com as contraprovas podem ser vistos no quadro I, em que foram os diferentes meios semeados com *Clostridium Welchii*, amostra 21, bôa produtora de H<sup>2</sup>S.

Quadro I

	2 hs. 30	3 hs.	3 hs. 30	4 hs.	4 hs. 30	6 hs.	7 hs.	24 hs.
Meio I	±	+	+	+	+	+	+++	++++
Meio II	±	±	±	±	±	+	+	++++
Meio III	±	+	+	+	+	++	++	++++
Meio IV	±	±	±	±	+	+	++	++++
Meio V	-	±	+	+	+	++	-+	++++
Meio VI	±	±	±	±	±	+	+	++++
Meio VII	-	±	±	±	±	±	+	++++
Meio VIII	±	±	±	±	±	+	+	++++

Notações: - negativo, ± traços, ± fraca produção, + a ++++ graus de produção.

Nas leituras procedidas no correr das 24 horas de incubação observamos que com 10% de concentração de extrato de fígado-baço houvera notavel produção de H<sup>2</sup>S dentro de 6 horas de vegetação e que já com 3 horas o escurecimento era francamente visivel. O meio facultava a leitura, portanto, dentro do mesmo dia da prova. Com concentrações menores a quantidade final de H<sup>2</sup>S foi sempre a mesma mas sua produção se tornava consideravelmente mais lenta.

E' oportuno assinalar que a nós interessava obter um meio de produção rapida de H<sup>2</sup>S, possuindo um indicador igualmente rapido.

Fixada a proporção ótima de extrato restava comparal-o com o meio primitivo proposto por nós. E' o que se vê no quadro II, onde se verifica que a modificação foi vantajosa, não só tendo sido apressada a produção de H<sup>2</sup>S, dando reações precoces com o bismuto, como também indicando a presença deste gaz em amostras de anaerobios até agora admitidas não sulfurigenas como o *Cl. histolyticum*. Experimentando varias amostras para verificar a sensibilidade do meio, em comparação, encontramos maior sensibilidade do meio com extrato fígado-baço. Com o *Cl. Novyi* 152, que não revelou o meio primitivo a produção de H<sup>2</sup>S foi este patenteado plenamente no meio com extrato de fígado-baço. Com o *Cl. septicum* em que a produção no primeiro foi fraca, e só observada com 24 horas, era evidente em 6 horas com o meio com extrato de fígado-baço.

Outro detalhe examinado no preparo do meio foi em relação á junção da cistina. Experimentamos adicional-a á parte, em solução esterilizada a frio, por filtração em vela esterilizante, para evitar ligeiro escurecimento aparecido no meio durante a esterilização, quando a cistina era adicionada antes dessa operação. A cistina só se dissolve e se mantém dissolvida em presença de acido e essa particularidade dificulta sua junção ao meio depois de esterilizado, com pH já acertado, obrigando á inconveniente abertura posterior do continente para reajustamento da reação. A acidificação foi tão consideravel com a junção posterior da cistina que o meio deixou de dar indicação da formação de gaz por ter-se tornado improprio á vegetação bacteriana. Também tentamos dissolver a cistina em meio acido e depois de neutralisal-a juntar ao meio, mas os resultados foram menos bons. A vista disto permanecemos como anteriormente, juntando a cistina, ajustando o pH e em seguida esterilizando.

Fixadas as bases da preparação de meio restava aplical-o a um grande numero de amostras de clostridios e o fizemos em comparação com o meio proposto por Spray, para julgar de sua eficiencia e ao mesmo tempo investigar a capacidade sulfurigena dos clostridios anaerobios. Os resultados são vistos no quadro III.

Quadro II

		1 h. 30	2 hs.	2 hs. 30	3 hs.	3 hs. 30	4 hs.	4 hs. 30	6 hs.	7 hs.	24 hs.	48 hs.
Cl. Welchii (Cl. 21)	Meio I	-	-	±	±	±	+	+	+++	+++	++++	+++++
	Meio II	±	+	+	+++	+++	+++	++++	+++++	++++	++++	+++++
Cl. histoliticum (Cl. 107)	Meio I	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+++	+++++
	Meio II	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+++	+++++
Cl. Novyi (Cl. 152)	Meio I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Meio II	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+++	+++++
Cl. tetani (Cl. 244)	Meio I	-	-	-	±	±	±	±	+	+	++	+++++
	Meio II	-	-	±	±	±	±	±	+	+	+++	+++++
Cl. septicum (Cl. 70)	Meio I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Meio II	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	++

I — Meio primitivo de Pacheco & Mello.

II — Meio modificado, com extracto figado-baço.

Quadro III

Nome	Amostra	Meios	HORAS						
			2	3	4	5	6	24	96
Cl. septicum	Cl. 51	I II	- -	- -	- -	- -	- -	++ -	++++ -
	Cl. 52	I II	- -	- -	± -	+ -	+ -	++++ -	++++ +
	Cl. 53	I II	- -	± -	+ -	+ -	+ -	++++ +	++++ ±
	Cl. 54	I II	- -	- -	- -	- -	- -	++ -	++++ -
	Cl. 55	I II	± -	+ -	+ -	+ +	+ +	++++ +	++++ +
Cl. histolyticum	Cl. 100	I II	± -	± -	± -	± -	+ -	+++ -	++++ ±
	Cl. 101	I II	- -	- -	- -	- -	- -	++ -	++++ -
	Cl. 104	I II	- -	- -	± -	± -	± -	++ -	++++ -
	Cl. 105	I II	± -	± -	± -	± -	± -	+++ -	++++ -
Cl. Novyi	Cl. 150	I II	± -	+ -	+ -	++ -	++ +	++++ +	++++ +
	Cl. 152	I II	- -	- -	± -	± -	± -	++ -	++++ -
	Cl. 153	I II	± -	± -	+ -	+ -	+ -	+++ -	++++ ±
Cl. Sordelli	Cl. 220	I II	+ -	++ -	++ -	+++ -	+++ ±	++++ ±	++++ ±
	Cl. 221	I II	+ -	++ -	++ -	+++ -	+++ ±	++++ ±	++++ +
	Cl. 222	I II	± -	++ -	++ -	++ -	+++ -	++++ -	++++ -
	Cl. 224	I II	± -	++ -	++ -	++ -	+++ -	++++ +	++++ ±
	Cl. 225	I II	± -	++ -	+++ -	+++ +	+++ +	++++ ±	++++ ±
Cl. tetani	Cl. 230	I II	± -	+ -	+ -	+ -	+ -	++++ +	++++ ±
	Cl. 231	I II	- -	± -	± -	± -	± +	++ ±	++++ ±
	Cl. 232	I II	- -	± -	+ -	+ -	+ -	++++ ±	++++ ±
	Cl. 233	I II	- -	± -	+ -	+ -	+ -	++++ +	++++ ±
	Cl. 235	I II	+ -	+ -	+ ±	+ ±	+ ±	++++ +	++++ +
Cl. botulinum	Cl. 350	I II	- -	± -	+ -	+ -	+ +	++++ +	++++ +
	Cl. 351	I II	- -	± -	± -	+ -	+ -	++++ -	++++ ±
	Cl. 352	I II	- -	- -	± -	+ -	+ -	++++ -	++++ ±
	Cl. 365	I II	- -	- -	- -	- -	- -	+++ -	++++ +
	Cl. 366	I II	- -	± -	± -	+ -	+ -	++++ +	++++ ±
	Cl. 369	I II	- -	- -	- -	- -	- -	+ -	++ -
Cl. tertius	Cl. 400	I II	± -	± -	± -	+ +	+ +	++ +	++++ +
	Cl. 401	I II	- -	- -	- -	+ ±	+ ±	++ ±	++++ ±
	Cl. 404	I II	- -	± -	± -	+ +	+ +	++ +	++++ +
Cl. bifermentans	Cl. 430	I II	± -	++ -	++ -	+++ ±	+++ ±	++++ +	++++ +
	Cl. 432	I II	+ -	++ -	++ -	+++ -	+++ -	++++ ±	++++ ±
Cl. tetanomorphum	Cl. 443	I II	- -	- -	± -	± -	± -	++++ -	++++ +
	Cl. 444	I II	± -	± -	± -	± -	± -	++++ -	++++ ±
Cl. sphenoides	Cl. 475	I II	± -	+ -	+ -	+ -	+ -	++++ -	++++ -
Cl. fallax	Cl. 480	I II	± -	+ -	++ -	++ -	++ -	++++ ±	++++ +

Nota — Nestas provas não incluímos o *Cl. Welchii* porque já o viramos produzindo rapido e abundante H<sub>2</sub>S.  
 I — Meio com bismutho.  
 II — Meio com ferro (Spray).

Verifica-se pelo quadro que o meio com bismuto se mostrou consideravelmente superior ao meio proposto por Spray para revelar a presença de H<sup>2</sup>S nas culturas de anaeróbios.

As reações observadas no meio com bismuto foram extremamente nitidas, destacando-se desde início pela tonalidade castanha, que se acentua até negro nas reações fortes, dentro de 24 horas de cultura.

Outro tanto não sucede com o meio Spray, no qual raramente se percebe a reação no mesmo dia da sementeira, e após 72 horas de incubação ainda se fica às vezes em dúvida para decidir da positividade, indicativa da presença de H<sup>2</sup>S. Sempre se deve fazer a leitura da prova de Spray contra o fundo branco, nunca por transparência.

Outra vantagem do meio com bismuto na fórmula ora proposta é a precocidade da reação. Nas espécies fortemente sulfurígenas, como o *Cl. Welchii*, é ela francamente visível com 2 horas de cultura a 37°. E esta vantagem não é para se desprezar, si por acaso a prova tiver importância na especificação rápida de uma dada amostra.

Revelou-se perfeitamente sensível o meio de bismuto na demonstração da capacidade sulfurígena de todos clostrídios anaeróbios experimentados. Encontraram-se amostras de uma ou de outra espécie, lenta ou fracamente sulfurígena, mas o gás se formou sempre em todas as amostras ao cabo de 24 horas de cultura a 37°.

Foram produtores mais precoces o *Cl. Welchii*, *Cl. tetani*, *Cl. tertius*, *Cl. bifementans*, *Cl. sordelli*, *Cl. sphenoides* e o *Cl. fallax*.

#### RESUMO

- a) A junção de extrato de fígado-baço ao meio com bismuto se mostrou muito favorável no aumento da produção de H<sup>2</sup>S pelos clostrídios anaeróbios.
- b) O bismuto ajuntado ao meio com extrato fígado-baço revelou maior sensibilidade ao H<sup>2</sup>S que o meio com ferro de Spray.
- c) O emprego do meio extrato de fígado-baço-cistina, com indicador de carbonato de bismuto, revelou a produção abundante de H<sup>2</sup>S por todos os anaeróbios submetidos á prova de produção de H<sup>2</sup>S, o que não aconteceu com o emprego de ferro como indicador de reação.
- d) Certas espécies de clostrídios possuem capacidade sulfurígena mais precoce e intensa que outras.
- e) Ha variações individuais na precocidade da capacidade sulfurígena dos anaeróbios.

## SUMMARY

- a) The addition of liver-spleen extract to the medium with bismuth seems to have favored greatly the increase of the production of H<sup>2</sup>S by anaerobic clostridia.
- b) Bismuth added to the medium with liver-spleen extract showed greater sensibility to H<sup>2</sup>S than Spray's medium with iron.
- c) The employment of the liver-spleen-cystine medium, with bismuth carbonate as indicator, revealed an markedely production of the H<sup>2</sup>S by all the anaerobi submitted to the H<sup>2</sup>S production test, which was not the case when iron was used as indicator of the test.
- d) Some species of clostridia have an earlier and more intense sulphidrogenous capacity than others.
- e) There are individual variations among anaerobes in their capacity for early production of hydrogen sulphide.

## LITERATURA

## BERGEY ED AL

1939. Manual of Determinative Bacteriology.

## COLE &amp; ONSLOW APUD HILDRED M. BUTLER

1937. Blood Cultures and their significance. London.

## PACHECO, G. &amp; MELLO, J. T.

1932. Compt. rend. Soc. Biol., **110** : 131.

## PACHECO, G., NORONHA PERES, J. &amp; VIVIANI MATTOSO, I.

1939. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **34** : 527.

## SPRAY, R. S.

1936. Journ. Bacter., **32** : 135.

## TAROZZI, G.

1905. Centralbl. für Bakt. und Infek., **38** : 619.

## TYLLEY, F. W.

1923. Journ. Bact., **8** : 287.

## TOPLEY &amp; WILSON

Principles of Bacteriology and Immunity — Second Edition.

## VAUGHAN &amp; LEVINE

1936. Journ. Bact., **31** : 24.

## WEINBERG, M., NATIVELLE, R. &amp; PREVOT, A. B.

1937. Les microbes anaerobies.

## ZEISSLER, J.

1930. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen — (Kolle und Wassermann), 3.<sup>a</sup> Ed.: **10**.