

Investigações sobre a capacidade sulfurigena das bacterias *

por

Genesio Pacheco, José Noronha Péres e Italo Viviani Mattoso

(Com 2 graficos e 2 figuras no texto)

Apezar dos progressos no estudo da bioquímica bacteriana muitas provas utilizadas na especificação desses microorganismos exigem ainda acurado estudo para o necessario apuramento, isto é, para aumentar-lhes a sensibilidade e escoimal-as de erros que ocorrem com frequencia. Dentre essas provas está a da pesquisa do hidrogenio sulfurado.

Origina-se este corpo do enxofre existente na molecula proteica dos meios de cultura ou de substancias sulfuradas a êles adicionadas para aumentar ou facilitar a produção de H_2S pelas bacterias. Demonstraram Wohlgemuth (1), Sasaki & Otsuka (2), que a cistina era a principal fonte de H_2S produzida pelas bacterias na putrefação, e Tilley (3) verificou, com várias marcas de peptona utilizadas como fontes sulfurigenas, que a produção de H_2S dependia do teôr em cistina desses produtos. Tanner (4) encontrou produção de H_2S com peptona e com varios compostos sulfurados — tiouréa e tiosulfato de sódio, sob ação de varias especies bacterianas, não tendo observado produção deste gás com taurina, sulfito e sulfato de sodio.

A produção de H_2S pelas bacterias nos meios de cultura ficava, assim, adstrita á presença de compostos contendo enxofre na sua molecula. A analise das experiencias de Sasaki & Otsuka (2) revela aquilo que Tilley (3) observou tambem posteriormente, isto é, que tanto mais oxidado é o enxofre do corpo sulfurado quanto menos atacavel é este corpo pelas bacterias para produção de H_2S . Decorre da observação que devem ser preferidos nos meios de cultura para aumentar-lhes a produção de H_2S

* Recebido para publicação a 25 de Agosto de 1939 e dado á publicidade em Dezembro de 1939.

os corpos sulfurados nos quais o enxofre seja menos oxidado. Dentre estes foi aconselhado por Tilley a cistina.

Podendo ser aceita a junção da cistina, á vista do aumento de H_2S observado nas culturas bacterianas em que este corpo é adicionado ao meio nutritivo, torna-se aconselhavel o seu uso com esse fim.

Hunter & Crecelius (5) procuraram substituir a cistina pelo sulfito de sodio como fonte sulfurigena, adicionando-o a um agar peptonado (meio I). Antes deles, porém, Sasaki & Otsuka (2) haviam verificado que o sulfito de sodio era decomposto pelas bacterias com produção de H_2S , mas só o era por algumas bacterias dentre as ensaiadas por estes pesquisadores. Mostraram-se capazes de decompôr o sulfito os bacilos coli, paratifico B e disentericos, assim como o vibrião colerico. No grupo de bacterias incapazes de decompôr o sulfito de sodio com produção de H_2S figurava o *proteus*, bacteria reconhecida por todos das mais ativas produtoras de hidrogenio sulfurado nos meios de cultura. Ensaioando Wilson (6) a redução dos sulfitos pelas bacterias, valendo-se do acetato de chumbo e do clorêto de ferro como indicadores dessa redução, verificara êle serem capazes de realizar essa transformação os bacilos fermentadores da lactose (coli), numerosas salmonelas (paratifos), incluindo a *Salmonella typhosa*, excetuando-se a *Salmonella paratyphi* (paratifo A), *S. suipestifer*, *S. abortus-equi*, *S. gallinarum* e *S. pullorum*. Dentre as bacterias não redutoras figurava ainda o *proteus*. Não havia duvida, pois, teoricamente o meio de Hunter & Crecelius era inadequado á pesquisa de H_2S nas culturas bacterianas porque partia de uma propriedade não comum a muitas bacterias, dentre as quais algumas seguramente não dotadas de capacidade redutora do sulfito de sodio. Demais, como mostra o trabalho de Wilson, o sulfeto, um dos compostos resultantes da redução dos sulfitos, é capaz de enegrecer os indicadores usualmente utilizados para verificar a presença de H_2S . E' perfeitamente provavel que isto ocorra no meio de Hunter & Crecelius. Verificamos que bacterias seguramente sulfurigenas, como os *proteus* e as brucelas, não produziam escurecimento, e não seriam, portanto, sulfurigenas no meio proposto por esses pesquisadores, ao passo que as bacterias dotadas da capacidade de redução do sulfito acima referidas no trabalho de Wilson (6) mostraram

em nossas mãos capacidade escurecedora no meio por nós proposto anteriormente (12).

Observamos, por outro lado, que a supressão do sulfito de sodio na formula do meio por êles proposto fel-o perder a capacidade de escurecimento, apesar da sensibilidade incontestavel do liquor do bismuto ali conservado como indicador de reação, revelando que a « tryptona » não é suficientemente rica em cistina para ser utilizada como fonte de enxofre e que o escurecimento do meio deve correr por conta da redução do sulfito.

A redução do sulfito mereceu-nos mais demorada analise. Hunter & Creelius adicionam um assucar ao meio para aumentar-lhes a sensibilidade. Usam a principio glicose, depois manita, e Wilson tambem acrescentou glicose ao meio de cultura nas suas experiencias com sulfito, sem referir qualquer deles o motivo dessa junção de assucar, mas deixando transparecer os primeiros, ser sua presença indispensavel para o fenomeno da redução do composto sulfurado.

Já em 1898 chamara Bigelow (7) a atenção sobre a capacidade de certas substancias de retardar a oxidação espontanea do sulfito de sodio em solução aquosa pelo oxigenio do ar. Verificára êle que este efeito retardador da oxidação, a que chamou « *efeito catalisador negativo* », era mais intenso com a manita, entre varios corpos experimentados e possuidores dessa capacidade — glicerina, alcool isobutilico, tartarato de sodio, succinato de sodio, fenol e benzaldehido. Dentre as substancias dotadas de efeito catalisador negativo inclue-se o CO_2 , que deve ser eliminado sempre que se fizerem experiencias sobre oxidação do sulfito de sodio, para afastar essa causa de erro. Cada molecula de manita é capaz de proteger, segundo Bigelow, 800 mols de sulfito de sodio. Aventou Titoff (8) a hipótese do catalisador negativo da oxidação do sulfito atuar sobre a substancia catalisadora positiva existente na solução como impureza, hipótese tambem aceita por Bredig (9). No caso da oxidação do sulfito de sodio esse catalisador positivo seria o cobre, pois que traços de sais de cobre aceleram enormemente a oxidação do sulfito. Os catalisadores negativos, impedindo a oxidação do sulfito, permitem que este possa, por mais tempo, sofrer a ação dos germens. O grafico 1 mostra como a manita retarda o desaparecimento do sulfito em solução aquosa exposto á ação do ar.

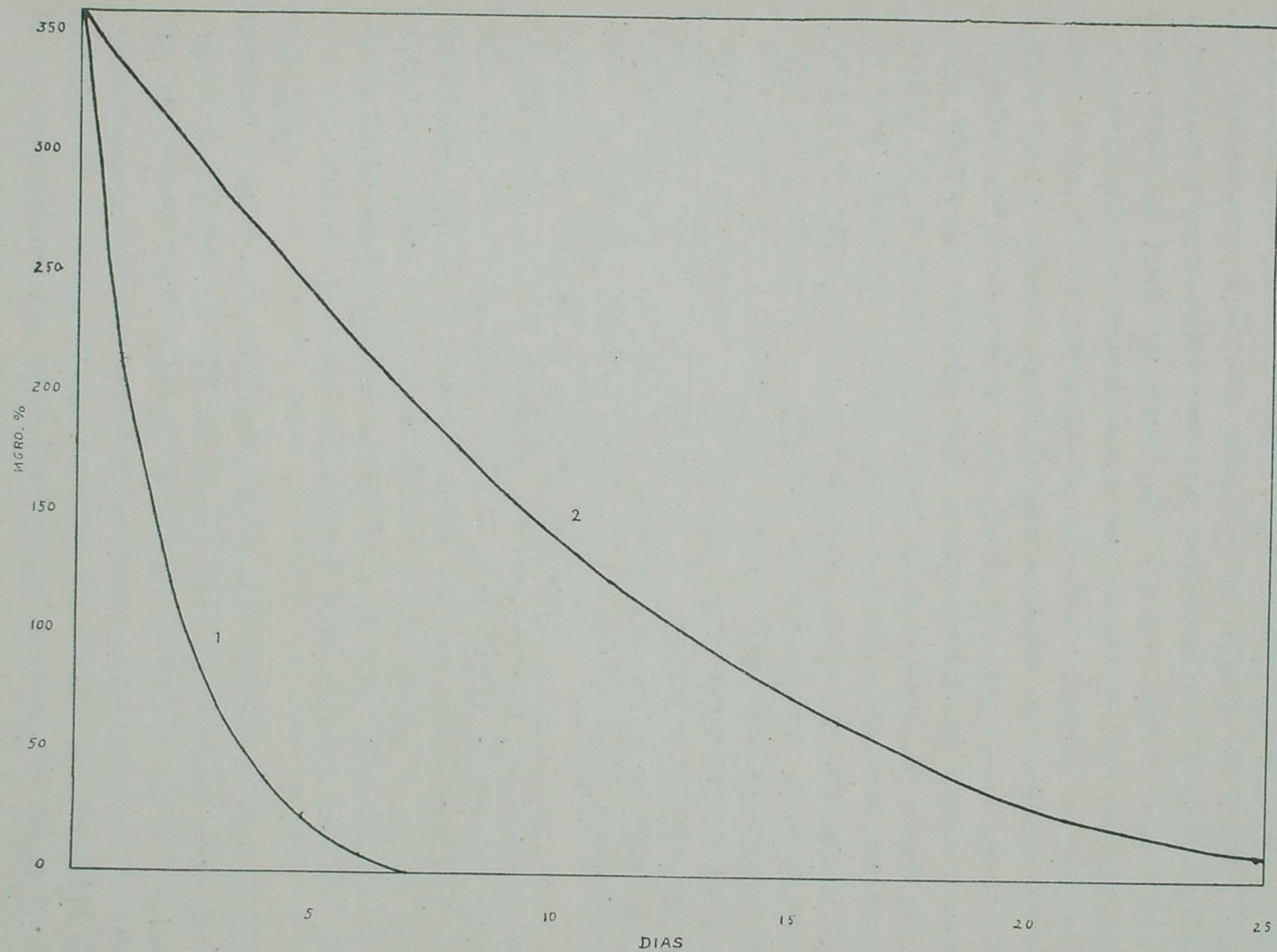


Gráfico 1 — Estudo da ação impediante da manita sobre a oxidação espontânea do sulfito em solução aquosa, à temperatura ambiente.

1) Sulfito em solução aquosa. 2) Sulfito na presença de manita.

A junção de manita ao meio de cultura com sulfito deve influenciar a decomposição deste corpo por aquele mecanismo. O estudo das constantes de velocidade de reação mostrou que as curvas são do tipo monomolecular. Houve ligeiro aumento da velocidade de reação no final, devido naturalmente á maior facilidade de oxidação das moléculas de sulfito, que se tornaram cada vez menos numerosas, pelo oxigenio que se vai dissolvendo nagua.

Ensaíamos a influencia de alguns assucares sobre a oxidação do sulfito de sodio, sob ação de uma corrente continua e constante de ar purificado. O debito era mantido constante tanto quanto possivel pelo conjunto dos frascos de Woulf, que criavam resistencias a vencer, ainda aumentadas á saída do primeiro frasco pela passagem do ar através um tubo estreitado. No primeiro frasco colocamos na tubuladura central um tubo largo, que servia de regulador da pressão; neste tubo havia uma variação da coluna de liquido de cerca de 25 cms. para contrabalançar as variações de pressão da maquina de ar comprimido. No frasco seguinte a variação oscilava apenas 1 cm., e nos demais era imperceptivel. Resultou do arranjo um debito de corrente de ar inferior ao utilizado por Bigelow (62 litros por hora). Prolongou-se o tempo de experimentação para 60 minutos, permitindo a lentidão do processo oxidante a mais facil organização das curvas. A taxa de oxidação não ultrapassou 25% neste espaço de tempo, a não ser para a sacarose, como se vê no grafico 2. Experimentamos a ação anticatalitica com outros assucares em comparação com a redução expontanea do sulfito.

Aumentamos o teôr de concentração do assucar acima do titulo empregado por Bigelow para poder apreciar melhor a conservação da solução de sulfito sob ação do ar atmosferico.

Infere-se dos resultados vistos no grafico 2 que exerceram ação catalitica negativa sobre a oxidação do sulfito a maltose, galatose, lactose, manita, glicose e a sacarose, pela ordem de capacidade anticatalitica. A sacarose, que não gosa de poder redutor, foi justamente dos disacarideos o que se nos revelou de menor ação anticatalitica dentre os experimentados na oxidação do sulfito.

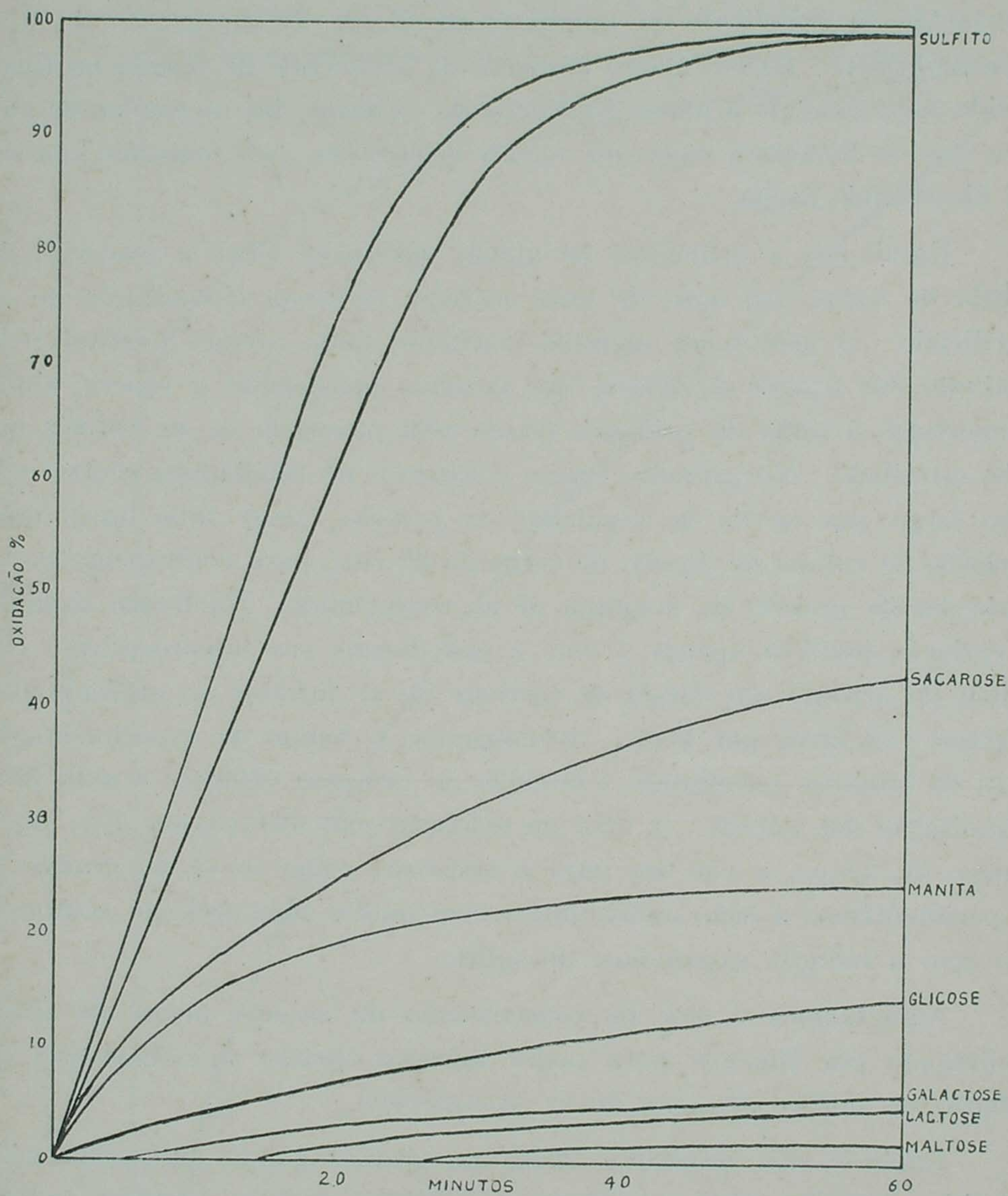
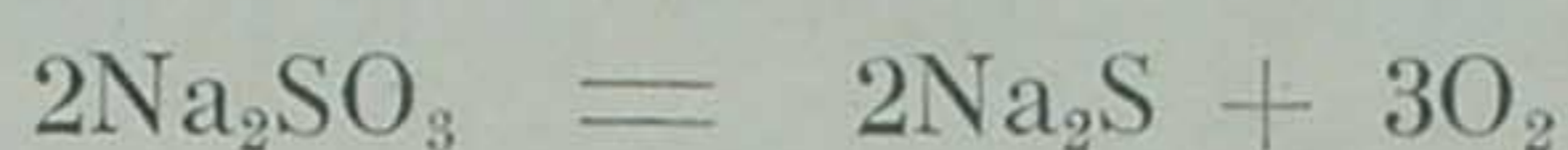


Gráfico 2 — Ação de varios assucares como catalizadores negativos da oxidação do sulfito de sodio por uma corrente de ar (62 litros por hora).

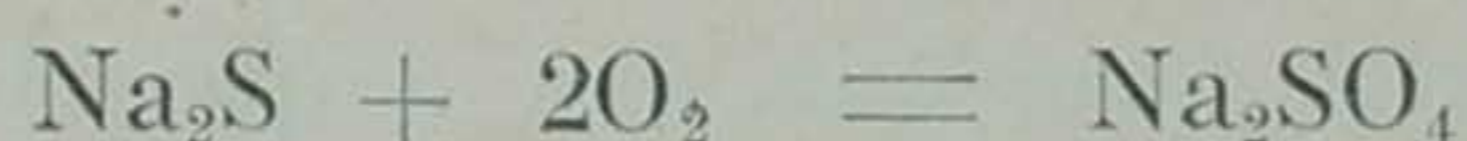
NOTA — Os assucares ensaiados fôram dissolvidos a M/200 e o sulfito a M/50. A manita serviu como ponto de referencia.

Nos meios de cultura contendo sulfito, semeados com bacterias, a redução exercida por estas sobre o sulfito se passaria retirando as bacterias o oxigenio do sal para seu metabolismo e transformando-o possivelmente em sulfeto, de acôrdo com a equação:



O sulfito em solução nos meios de cultura com bacterias tende a se transformar espontanea e rapidamente em sulfato, ás custas do oxigenio do ar dissolvido no meio ou do oxigenio resultante do metabolismo bacteriano, oxidação analoga á que sofre espontaneamente nas soluções.

O sulfito transformado em sulfeto pela ação bacteriana, como foi dito, pode ser fixado como sulfeto insolúvel em presença de um indicador conveniente — ferro, chumbo, bismuto, escurecendo-os. Teriamos assim uma indicação falsa da produção de H_2S , quando de fato o que haveria era unicamente uma redução do sulfito em sulfeto. Mas se isso não ocorre, pela ausencia de um fixador apropriado, êle sofre oxidação espontanea, transformando-se em sulfato, possivelmente sofrendo uma hidrólise prévia:



As nossas experiencias sobre a transformação do sulfito em sulfato não foram definitivamente concludentes porque na ausencia de sais fixadores do sulfeto não se obtinha evidencias da presença do ion sulfeto. Fizemos agir os germes sobre sulfito, na presença de manita (que êles fermentavam), mas no fim de 24, 48 ou 72 horas, ou ao fim de uma semana não se tinha libertado H_2S do meio.

Haviamos organizado um dispositivo para fixar o gás desprendido. A dosagem dos sulfetos teria importancia porque poderia se afastar com ela o erro da interpretação dos resultados no escurecimento do liquor de bismuto do meio de Hunter & Crecelius, que poderia provir desse corpo na decomposição do sulfito do meio, sob ação bacteriana, como vimos.

Facilmente conseguimos a distinção de sulfetos e sulfitos com sais soluveis de bismuto. A dificuldade encontrada para estimativa do sulfeto produzido com bacterias foi a solubilidade do sulfeto de bismuto (BiS_3) no excesso do reativo bismutico, não sendo possível empregar-se quantidade exata de reativo precipitante para o sulfeto porque o reativo de bismuto deve ser adicionado previamente para evitar a oxidação secundaria do sulfeto e sua transformação em sulfato.

A substituição da maniita pela lactose foi desfavoravel no acrescimo do escurecimento do meio como vemos no quadro 1.

Quadro 1

Provas comparativas no Meio de Hunter & Crecelius com maniita e latose.

| G e r m e n s | M a n i t a | L a t o s e |
|------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Salmonella typhosa</i> | +++ | — |
| <i>S. schottmülleri</i> | +++ | — |
| <i>Escherichia coli</i> 295 | — | — |
| <i>Shigella flexneri</i> 311 | — | ± ? |
| <i>Sh. sonnei</i> | — | ± ? |

Legenda: + reação positiva, indicada pela coloração castanho-escura do meio.
 — reação negativa.
 ± ? traços negros em determinadas partes do meio.

Outro ponto a esmiuçar na analise da modificação do meio de bismuto proposto por Hunter & Crecelius era a questão do sal de bismuto a empregar. Apura-se dos dados da literatura referida acima que o bismuto é o indicador mais sensível dos utilizados até o presente, e aquele que permite mais facilmente apreciar a produção de H_2S . Sobre este ponto não parece haver que discutir.

Resta examinar a sensibilidade do citrato de bismuto amoniacal em solução ou « liquor de bismuto ». Vimos acima que o meio de Hunter & Crecelius admite na sua composição uma fonte de enxofre inadequada á pesquisa da produção de H_2S , e que a supressão dessa fonte de enxofre suprimia ao mesmo tempo a propriedade do meio escurecer sob ação das bacterias. Poder-se-ia pensar que o enxofre das peptonas supriria essa falta, o que não se deu, e certamente já o viram aqueles pesquisadores, porque si não fôra assim não carecia ajuntar sulfito ao meio por êles proposto.

Encontramos dificuldades em obter partidas de meios limpídos em presença do liquor de bismuto, dificuldades referidas tambem por Hunter & Crecelius, mesmo utilizando a triptona « Difco ». Procurando esclarecer o motivo dessa irregularidade, pensamos na possibilidade de influir na precipitação o pH do meio.

Numa série de tubos contendo o meio de Hunter & Crecelius, com

pH variando de 6,0-7,4, com diferença de 0,2, foi visto que de pH 6,8 para baixo não havia precipitação, a qual ocorria com intensidade crescente a partir de 7,0. Experimentamos outras marcas de peptona, repetindo-se o fenomeno com regularidade. Concluimos ser destituída de fundamento a recomendação daqueles pesquisadores da necessidade de se usar unicamente a « triptona » Difco no preparo de seu meio.

Uma vez afastada essa dificuldade foi-nos facil preparar o meio com varias peptonas, para comparar a sensibilidade do indicador de liquor de bismuto, sem a presença do sulfito, fonte de enxofre vista inadequada, contando agora unicamente com o enxofre das peptonas, quasi sempre suficiente á produção de H_2S e revelavel pelas técnicas anteriores. Na concentração de 0,7%, teôr utilizado no meio de Hunter & Crecelius, não se observou escurecimento da cultura ou este era apenas esboçado, e mesmo assim tardiamente.

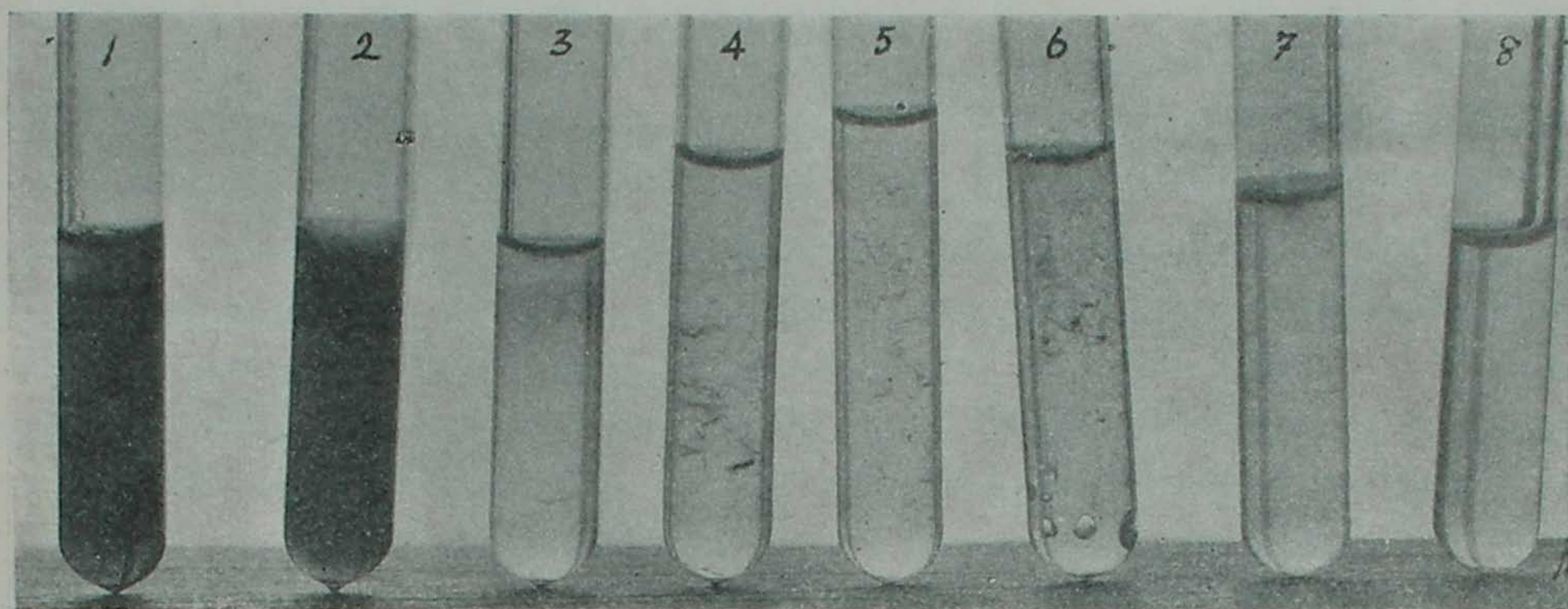
Utilizamos para analise da sensibilidade do liquor de bismuto como indicador da produção de H_2S um meio mineral adicionado de extrato de levedo « Difco » :

| | |
|---|---------|
| K_2HPO_4 | 0,02 |
| Agar | 0,5 |
| Mannita | 0,5 |
| Extrato de levedo | 0,5 |
| Sol. sulfito de sodio a 20%, recentemente preparada | 1,0 cc. |
| Liquor de bismuto | 0,5 cc. |
| Agua a completar | 100 cc. |

Esterilisar a 115° , ajustando o pH a 6,8 antes da junção do liquor de bismuto. Os resultados obtidos com este meio se sobrepõem aos do meio de Hunter & Crecelius, mostrando a nenhuma interferencia da « tryptona Difco » como fonte sulfurigena porque os resultados foram identicos. A supressão do sulfito no meio mineral acima não deixou escurecer os tubos semeados com as bacterias que o escureciam com sua presença.

Permite o meio mineral acima o crescimento da maioria das bacterias patogenicas, incluindo aquelas em que a verificação da produção de H_2S tem sido utilizada na sua especificação. O metabolismo do sulfito pode ser aqui estudado sem interferencia de outros corpos sulfurados como as peptonas ou certos acidos animados, o teôr de enxofre total do extrato de levedo sendo de 0,143%, fica praticamente desprezível juntado como é na taxa de 0,5% ao meio. O enxofre organico não

oxidado (cistina) pesquisado no extrato de levedo seguindo a técnica aconselhada por Hawk (10) foi negativa.



Fotografia 1

N.º 1 — *Salmonella typhosa* 0 901.

N.º 2 — *Salmonella schotmülleri* 2947.

N.º 3 — *Salmonella paratyphi* 1015.

N.º 4 — *Escherichia coli*.

N.º 5 — *Shigella flexneri*.

N.º 6 — *Proteus* sp. 424.

N.º 7 — *Proteus* sp. 481.

N.º 8 — Testemunha (não semeado).

Demonstra a fotografia 1 as gradações de escurecimento observada no meio de Hunter & Crecelius. Frequentemente aparecem nos tubos semeados com certas bacterias, estrias mais ou menos escuras, até negras, esparsas na massa do meio, dispostas sem ordem, as quais não progridem nem difundem como o escurecimento observado com outras bacterias assinaladas como enegrecedoras no trabalho daqueles autores e que também verificamos. Quando o sulfito é decomposto, o meio sofre escurecimento uniforme, na parte do meio onde houve maior proliferação bacteriana, ficando limitado á parte superior ou difundindo-se por toda a massa do meio.

O escurecimento vae desde um tom pardo-acastanhado até quasi negro, conforme o avançamento da redução do sulfito. A existencia das estrias escuras não significam produção de H_2S e correm por conta, talvez, de sulfeto formado pela decomposição espontanea do sulfito ou da redução espontanea do bismuto. Em todo caso essa alteração deixa dúvidas no espirito do analista quanto á presença de substancias reagindo sobre o bismuto (sulfeto ou hidrogenio sulfurados).

Verificada a impropriedade do emprego do liquor de bismuto e do sulfito, nenhuma duvida subsiste quanto á sensibilidade do bismuto como indicador para o H_2S produzido nas culturas bacterianas.

O meio com liquor de bismuto pode ser preparado com varias peptonas com resultados identicos como se verifica no quadro 2.

Quadro 2

Resultado do meio de Hunter & Crecelius preparado com varias peptonas.

| G e r m e n s | Triptona Difco | Proteose Difco | Peptona Witte |
|---------------------------|----------------|----------------|---------------|
| <i>Salmonella typhosa</i> | +++ | +++ | +++ |
| <i>S. paratyphi</i> | + | + | + |
| <i>S. schottmülleri</i> | +++ | +++ | +++ |
| <i>Proteus sp.</i> | ± | ± | ± |
| <i>Proteus mirabilis</i> | — | — | — |
| <i>Escherichia coli</i> | — | — | — |
| <i>Shigella flexneri</i> | — | — | — |

Cotejamos ainda o meio de carbonato e o de citrato de bismuto amoniacoal (liquor de bismuto), semeados com proteus e com brucelas, podendo-se verificar nitidamente a superioridade do carbonato sobre o liquor de bismuto (quadro 3).

Quadro 3

Produção de H₂S em meios com liquor de bismuto e com carbonato de bismuto.

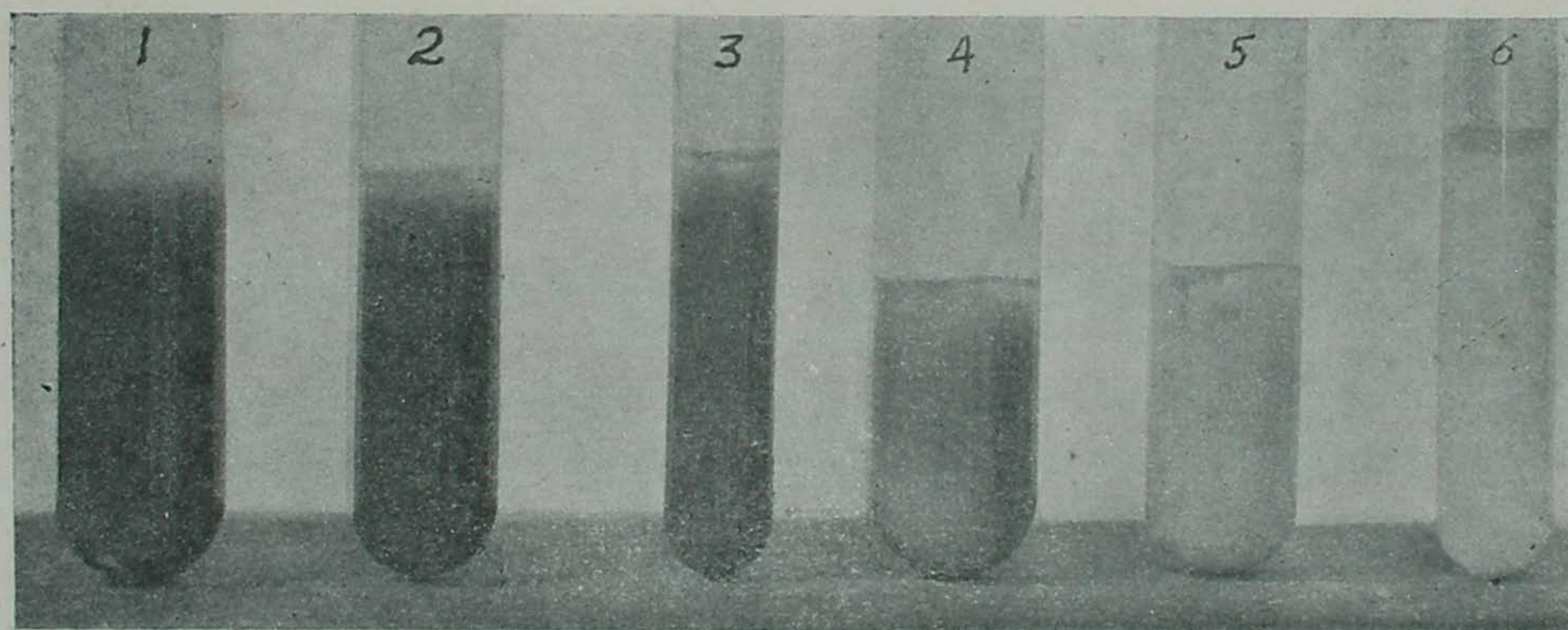
| G e r m e n s | Meio de Hunter & Crecelius [com liquor de bismuto] | Meio de Pacheco & Mello [com cistina e carbonato de bismuto] |
|---------------------------------|---|---|
| <i>Proteus</i> OX 19 | — | +++ |
| <i>Proteus</i> OX 2 | — | +++ |
| <i>Proteus</i> OXK | — | +++ |
| <i>Proteus</i> OXL | — | +++ |
| <i>Proteus mirabilis</i> 296 | — | +++ |
| <i>Proteus vulgaris</i> 158 | — | +++ |
| <i>Proteus sp.</i> 424 | — | +++ |
| <i>Brucela paramelitensis</i> 1 | — | — |
| <i>Brucela melitensis</i> 4 | — | — |
| <i>Brucela abortus</i> 6 | — | +++ |
| <i>Brucela abortus</i> 3 | — | +++ |
| <i>Brucela suis</i> 8 | — | +++ |
| <i>Brucela suis</i> 12 | — | +++ |
| <i>Brucela suis</i> 11 | — | +++ |

Evidenciada a vantagem da cistina como fonte sulfurigena para produção de H_2S , permitindo utilizar-se qualquer peptona para fonte nutritiva das bacterias, preparamos o meio anteriormente proposto por nós da seguinte maneira:

| | |
|----------------------|---------|
| Peptona | 3,0 |
| Agar | 0,5 |
| Cloreto de sodio | 0,5 |
| Carbonato de bismuto | 0,5 |
| Cistina | 0,01 |
| Agua | 100 cc. |

Os tubos contendo o meio de cultura ainda quente devem ser fortemente agitados e em seguida resfriados rapidamente para distribuição uniforme do indicador, que tende a depositar.

A fotografia 2 mostra os resultados de diferentes bacterias sementeadas neste meio.



Fotografia 2

Meio de Pacheco e Mello com cistina.

- N.º 1 — *Proteus* sp. 481, isolado de fezes, da coleção do I. O. C.
 N.º 2 — *Salmonella schotmülleri* 2947.
 N.º 3 — *Proteus vulgaris*.
 N.º 4 — *Salmonella typhosa* 0 901.
 N.º 5 — *Salmonella paratyphi*.
 N.º 6 — Testemunha (não semeado).

RELAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILISADAS NAS EXPERIENCIAS

Salmonella typhosa 0-901, *S. paratyphi* 1.015, *S. schottmuelleri* 2.947, recebidas do Prof. F. Kauffmann;

Escherichia coli 295 (original de Escherich), *Shigella sonnei* 268, *Proteus mirabilis*, P. O X 19, P. O P. O X K, *Brucella melitensis*, da N. C. T. C.;

Shigella flexneri (*Sh. paradysenteriae* var. Flexner) amostra Oxford (N. C. T. C.), *Proteus* X L, recebidas do Dr. Carvalho Lima, de S. Paulo;

Proteus sp., isolada de feses no Instituto Oswaldo Cruz, n. 424 da nossa coleção;

Brucella paramelitensis, recebida do Prof. Mazza da Rep. Argentina;

B. abortus, recebida do Prof. Rosenbuch, Rep. Argentina;

B. suis amostras ns. 2 e John, recebidas de Huddleson, Estados Unidos;

B. suis, isolada por A. Penha, em S. Paulo.

DISCUSSÃO

A bioquímica fornece ainda um dos elementos fundamentais da sistemática das bactérias. Até certa época foi mesmo a base principal da especificação, tendo-se reconhecido desde cedo ser a morfologia um caráter de pequena significação para a distinção das espécies bacterianas. Apesar do domínio crescente da análise antigenica e das recentes e futuras investigações da química bacteriana sobre a especificação, o conhecimento da bioquímica, resumida nas alterações de natureza enzimática principalmente, exercida pelas bactérias sobre os meios de cultura ou sobre substâncias a estes adicionadas, guarda ainda destacado lugar na especificação.

A pesquisa do hidrogênio sulfurado serviu a Huddleson (11) para distinção de brucelas, e sua presença é constante na putrefação ou decomposição das proteínas. Indicadores e métodos mais ou menos sensíveis foram propostos para verificação de sua presença, sobresaindo deles, pela sensibilidade e facilidade de leitura dos resultados, o carbonato de

bismuto, proposto por Pacheco & Mello em 1932 (12). Ainda recentemente Wada (13) compara varios sais como indicadores de hidrogenio sulfurado — bismuto, ferro, chumbo, niquel, manganez, cobre e zinco, e conclue que o mais apropriado deles é justamente o bismuto.

Posteriormente Hunter & Crecelius propuzeram um sal de bismuto soluvel para indicador de produção de H_2S , o citrato de bismuto, num meio contendo sulfito de sodio como fonte sulfurigena. Encontraram Hunter & Crecelius dificuldades no preparo do meio com a superveniencia de um precipitado que ocorre raras vezes, dizem eles, com a « tryptona Difco ». Essa precipitação seria uma dificuldade introduzida na preparação do meio, acrescida a esta outra da obrigatoriedade do uso de determinado tipo de peptona para seu preparo, a tryptona Difco. Indagando os motivos dessa precipitação verificamos estar na dependencia estreita da alcalinidade do meio. De fato, em concentrações acima de pH 6,8 ia aparecendo no meio um precipitado, qualquer que fôsse a peptona utilizada na preparação (triptona e neopeptona Difco, peptona Witte, peptona Chapoteau).

O uso das peptonas como fonte sulfurigena unica apresentava inconvenientes pelo teor variado de enxofre de sua composição, dependente ainda das varias partidas desse produto, mesmo dos melhores fabricantes. E talvez por isso mesmo adicionam aqueles pesquisadores uma fonte sulfurigena ao seu meio, em proporção determinada. Essa fonte sulfurigena se nos revelou impropria á pesquisa do H_2S , seja porque não ficou demonstrada, nem nos foi possivel apurar com segurança, si o corpo enegrecedor do citrato de bismuto daquele meio era H_2S ou o sulfeto, ambos podendo resultar da decomposição parcial do sulfito e reagindo sobre o bismuto com escurecimento, seja ainda porque esse corpo sofre decomposição espontanea. Os resultados obtidos com o meio de Hunter & Crecelius dependem certamente de uma propriedade peculiar a certo e limitado numero de bacterias, a capacidade decomponedora do sulfito, já vista por Wilson nos seus estudos sobre a aplicação do sal de ferro em meios seletivos para bacterias patogenicas intestinais. A impropriedade do sulfito ficara bem evidenciada nas pesquisas de Sasaki & Otsuka, e nas de Wilson. Tambem nossas observações demonstraram sua inefficiencia em revelar a presença de H_2S nas culturas de proteus e brucelas, bacterias reconhecidamente dotadas de capacidade produtora de H_2S .

A necessidade da junção de um assucar ao meio contendo sulfito pode depender da ação anticatalitica sobre a decomposição espontanea do sulfito descoberta por Bigelow, ou de influencias dependentes dos produtos resultantes da fermentação do assucar.

Não ha duvida que o escurecimento do meio resulta da decomposi-

ção do sulfito em sulfeto ou hidrogenio sulfurado, e a supressão do sulfito faz o meio perder a sensibilidade, apesar da presença do bismuto.

Hunter & Crecelius observam a formação de um precipitado no meio cuja causa atribuem a impurezas das peptonas, tendo nós apurado depender de uma precipitação ocorrida na zona de pH 7,0 para cima e crescendo com ele, não se observando com pH 6,8 para baixo. Assim pode o seu meio ser preparado com qualquer peptona.

O meio de Hunter & Crecelius serve exclusivamente á pesquisa da decomposição do sulfito de sodio pelas bacterias, de que pode resultar a formação de sulfeto ou hidrogenio sulfurado. Não se presta a provas da capacidade sulfurigena das bacterias.

Apurados os inconvenientes do meio com citrato de bismuto para pesquisa de H_2S , restava comparal-o como meio original de bismuto proposto por nós. Resultou do cotejo maior sensibilidade deste sobre o meio de Hunter & Crecelius. A opacidade do meio de Pacheco & Mello, que parece ter sido o motivo das tentativas daqueles pesquisadores com um sal soluvel para obter meios transparentes, embora não se refiram a ela diretamente, em nada impede a leitura do escurecimento, antes a nós nos parece vantajosa porque dispensa a leitura sobre fundo branco como no meio de Hunter & Crecelius. Demais, estes pesquisadores aconselham adicionar leite ás partidas do meio com precipitados referido acima, designando-o, então, meio II. A precipitação do meio II não o inutiliza para a pesquisa, vimol-o bem, e a junção de leite torna o meio tão opaco como o de carbonato. Si a opacidade fosse motivo de inutilidade de um meio para provas bioquímicas, o leite teria sido ha muito banido da rotina bacteriologica.

No meio transparente de Hunter & Crecelius ha precipitações escuras, sob forma de estrias, e escurecimentos parciais, que dificultam a leitura ou deixam duvidas nos resultados, inconvenientes não observados no meio opaco com carbonato de bismuto.

CONCLUSÕES

- a) O sulfito de sodio é inapropriado como fonte de enxofre para produção de H_2S nas culturas bacterianas porque numero relativamente pequeno de bacterias é capaz de decompô-lo, e dentre elas não se incluem especies sabidamente sulfurigenas;
- b) Podem resultar da decomposição do sulfito, sulfeto e hidrogenio sulfurado, ambos dotados da capacidade de escurecer o bismuto;

- c) A necessidade de junção da manita ao meio, para aumentar a produção de H_2S , póde depender em parte da ação anticatalítica de Bigelow;
- d) Outros assucares, além da manita, exercem a ação anticatalítica de Bigelow;
- e) O meio com liquor de bismuto não revela a produção de H_2S por bacterias seguramente sulfurigenas: proteus e brucelas;
- f) O liquor de bismuto se mostrou menos sensível que o carbonato de bismuto para revelar a produção de H_2S pelas bacterias;
- g) Ha dificuldades no preparo e na interpretação dos resultados no meio com liquor de bismuto, dificuldades não existentes com o carbonato de bismuto;
- h) A precipitação das peptonas pelo liquor de bismuto é devida á alcalinidade do meio;
- i) O meio de Hunter & Crecelius se presta apenas á prova de decomposição do sulfito de sodio pelas bacterias. Não se presta á pesquisa do H_2S .

DISCUSSION

Biochemistry still furnishes one of the fundamental elements in the determination of bacteria. Up to a certain time it was the principal basis of classification, for it was early recognised that morphology alone had little significance in the determination of species of bacteria. In spite of the growing importance of antigenic analyses and the recent and promising investigations of bacterial chemistry for classification, the findings of biochemistry, especially that dealing with the alterations of an enzymatic nature brought about by bacteria on culture media or on substances added thereto, still occupy an important place in classification.

The hydrogen sulphide test enabled Huddleson (11) to distinguish *brucella*, and its presence is constant in the putrefaction or decomposition of proteins. Indicators and more or less sensitive methods were proposed to ascertain its presence, the most successful of these, because of its greater sensitivity and greater facility in reading of results, being the bismuth carbonate proposed by us in 1932 (12). Recently Wada (13) compared various salts as detectors of hydrogen sulphide — bismuth, iron, lead, nickel, manganese, copper and zinc — and concluded that the

most appropriate is really the bismuth. The medium with bismuth carbonate was compared by Motta (14), with media employing lead and iron, the former always proving the most advantageous.

Later, Hunter & Crecelius proposed a soluble bismuth salt as indicator of the production of H_2S , i. e. bismuth citrate in a medium containing sodium sulphite as the sulphur source. Hunter & Crecelius found difficulty in the preparation of the medium because of the occurrence of a precipitate which they say is encountered rarely when « Tryptona Difco » is used. This precipitation constitutes a difficulty which must be added to that arising from the fact that a certain type of peptone must be used in the preparation of the medium, Tryptona Difco. Searching for the cause of this precipitation we found that it was closely related to the alkalinity of the medium. In fact, in concentrations with a pH above 6.8 the precipitate begins to appear in the medium, increasing with the pH, while at 6.8 and below no turbidity occurs, no matter what the peptone used in the preparation (tryptona or neopeptona Difco, peptone Witte, peptone Chapoteau).

The use of peptones as sole source of sulphur presented difficulties because of the unequal sulphur content in various lots put out by even the best manufacturers. And perhaps it is because of this that the authors cited add a sulphur source to their medium in known quantities. This source of sulphur seems to us inappropriate for the search of H_2S , first, because it was not demonstrated nor was it possible for us to ascertain with accuracy whether the darkening agent of the bismuth citrate in the medium was the H_2S or the sulphide, it being possible for both to result from the partial decomposition of the sulphite and react on the bismuth with darkening; and second, because the bismuth may undergo spontaneous decomposition. The results obtained with the medium of Hunter & Crecelius actually depend on a property which is peculiar to a certain and limited number of bacteria, that is, the decomposition of the sulphite already shown by Wilson in his researches on the use of iron salts in selective media for intestinal pathologic bacteria. The inappropriateness of sulphite was well shown in the researches of Sasaki & Otsuka and in those of Wilson. Our observations also demonstrated its inefficiency in revealing the presence of H_2S in cultures of *Proteus* and *Brucella*, bacteria which are well known for their hydrogen sulphide production capacity.

The necessity for the addition of a sugar to the medium containing sulphite may depend on the anti-catalytic action on the spontaneous decomposition of the sulphite, discovered by Bigelow, or on influences exerted by the fermentation of the sugar.

There is no doubt that the darkening of the medium is due to the

decomposition of the sulphite into sulphide or hydrogen sulphide, and the suppression of the sulphite results in the loss of sensitivity of the medium in spite of the presence of bismuth.

Hunter & Crecelius observed the formation of a precipitate in the medium which they attributed to impurities in the peptones, whereas we ascertained that it occurs only in the range of pH 7.0 upwards, increasing with the pH, and that it does not occur from pH 6.8 downwards. Their medium therefore, may be appropriate with any peptone.

The medium of Hunter & Crecelius serves exclusively for the study of the decomposition of sodium sulphite by bacteria, from which the formation of sulphide or hydrogen sulphide may result. It is not suitable for experiments on the sulphur producing power of the bacteria.

Once the disadvantages of the medium bismuth citrate in testing for H_2S were ascertained, we compared it with the original bismuth medium proposed by ourselves, and the latter proved more sensitive. The opacity of the medium of Pacheco & Mello which seems to have given rise to the experiments of Hunter & Crecelius with a soluble salt in order to obtain transparent media, although they do not refer to this directly, does not hinder the reading of the degree of darkening, but rather seems to us more advantageous because it renders unnecessary reading the result against a white background as in the medium of Hunter & Crecelius. Furthermore, these workers advise adding milk to the lots of medium with the precipitates referred to above, calling it, then, Medium II. Precipitation in Medium I does not invalidate it for experiments, as we have seen, and the addition of milk renders the medium as opaque as that carbonate. If opacity rendered a medium useless for biochemical tests, milk would long since have been banished from bacteriological routine.

In the medium of Hunter & Crecelius there occur streaks of dark precipitate, and partial darkening, which hinder the reading or leave one in doubt as to the results, difficulties which do not arise when using the opaque medium with bismuth carbonate.

CONCLUSIONS

- a) Sodium sulphite is inappropriate as source of sulphur for the production of H_2S in bacterial cultures because only a relatively small number of bacteria are capable of producing its decomposition and among them are not included admittedly sulphur-producing species;
- b) From the decomposition of the sodium sulphite, sulphide and hydrogen sulphide may occur, both of which may darken the bismuth:

- c) The necessity of adding mannite to the medium in order to increase the production of H_2S may depend in part of Bigelow's anti-catalytic action;
- d) Other sugars, beside mannite, also exercise Bigelow's anti-catalytic action;
- e) The medium employing bismuth liquor does not reveal the production of H_2S by bacteria which are surely sulphur-producing — *proteus* and *brucella*;
- f) Bismuth liquor was shown to be less sensitive than bismuth carbonate in revealing the production of H_2S by bacteria;
- g) There are difficulties in the preparation of the medium with bismuth liquor and in the interpretation of the results obtained, which do not occur when bismuth carbonate is used;
- h) Precipitation of the peptones by the bismuth liquor is due to the alkalinity of the medium;
- i) The medium of Hunter & Crecelius is useful only in tests of decomposition of sodium sulphite by bacteria. It is not useful in tests for the presence of H_2S in bacterian cultures.

BIBLIOGRAFIA

- 1) WOHLGEMUTH, J.
Zeit. f. phys. Chem., **43** : 641.
- 2) SASAKI, T. & OTSUKA, I.
1912. Biochem. Zeitsch., **39** : 208.
- 3) TILLEY, F. W.
1923. Journ. Bact., **8** : 287.
- 4) TANNER, F. W.
1917. Journ. Bact., **2** : 585.
- 5) HUNTER, C. A. & CRECELIUS, H. G.
1938. Journ. Bact., **35** : 185.
- 6) WILSON, W. J.
1923. Journ. Hyg., **21** : 392.
- 7) BIGELOW
1898. Zeitsch. phys. Chem., **26** : 493.

- 8) TITOFF
1903. *Zeit. phys. Chem.*, **45** : 662.
 - 9) BREDIG
1931. *In* Ullmann, *Enciclopedia Quim. Ind.*, Barcelona, **1**.
 - 10) HAWK, P. B. & BERGEIM, O.
1937. *Pract. Phys. Chem.* 11 ed., Philad.
 - 11) HUDDLESON, I. F. & ABELL, E.
1927. *Journ. Bact.*, **13** : 13.
HUDDLESON, I. F.
Mich. St. College, Agric. Exp. Sta., Tec. Bull., **100**.
 - 12) PACHECO, G. & MELLO, J. T.
1932. *Comp. rend. Soc. Biol.*, **110** : 131.
 - 13) WADA, S.
1936. *Zent. f. Bakt., ref.*, **121** : 448.
 - 14) MOTTA, L. M. J.
1934. *Bras. Med.*, **14** : 244.
-