

Fermentação da gelose pelas bacterias anaerobias *

por

Genesio Pacheco, Italo Viviani Mattoso e
Gobert Araujo Costa

Têm se tornado frequentes nos ultimos tempos as referencias a germens capazes de utilizar a gelose para suas necessidades metabolicas. O agar é fermentado, sendo utilizado seus productos de degradação pelas bacterias, liquefazendo-se o meio. O largo emprego do agar em bacteriologia torna seu estudo sob este aspéto sobremaneira valioso, especialmente quando usado em meios semisolidos para provas de fermentação bacteriana.

O agar-agar é retirado de algas marinhas pertencentes aos generos *Gelidium*, *Gracilaria*, *Eucheuma*, *Cloiopeltis* e outros, abundantes no Japão, mas existentes tambem em varias outras regiões do globo. Dentre ellas é a *Gelidium amansii*, a mais usada, sendo contudo empregadas varias outras — *Gelidium polycladum*, *G. elegans*, *G. japonicum*, *G. subcostatum* (mais modernamente classificada como *Acanthopeltis japonica*), *Gracilaria lichenoides* e a *Eucheuma spinosum* segundo Fredichs, Arends e Zörnig.

O agar-agar contém, ao lado de varias impurezas, cerca de 40% de gelose, a substancia gelificante. Segundo Frerichs, Arends e Zörnig, sua composição seria:

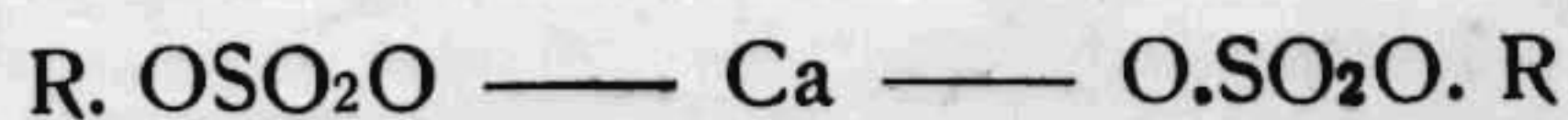
Gelose (Pararabina)	37,0 %
Paramylana	6,5 %
Metarabina	1,3 %
Substancias gomosas	3,0 %
Celulose	10,0 %
Substancias proteicas	7,5 %
Cinzas	4,0 %
Humidade	15,0 %

* Recebido para publicação a 22 de Janeiro de 1940 e dado á publicidade em Abril de 1940.

A gelose é uma hemicelulose. Com iodo dá coloração violeta. Por tratamento com ácidos minerais diluídos a quente se hidrolisa, dando galactose. Pirie obtem hidrolise completa pelo aquecimento com H^2SO^4 á fervura durante 1 hora.

A gelose é uma galactana, isto é, dá principalmente galactose por hidrolise, embora não seja um polisacarideo, « sensu strictu », pois contém em sua molecula outros elementos além do carbohidrato galactose. Admite-se que seja constituída principalmente pela combinação esterea do carbohidrato com acido sulfurico.

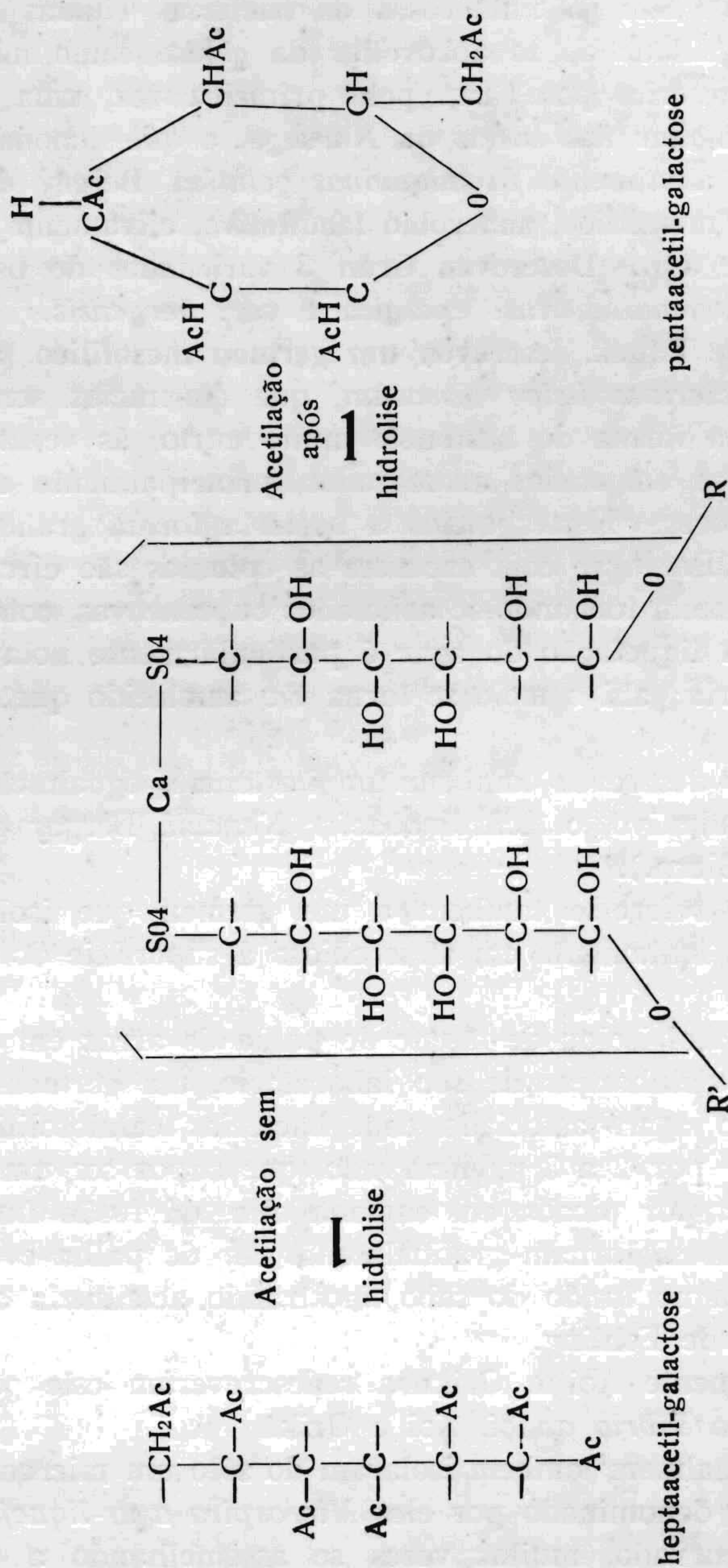
Samec e Ssajevic sugeriram que a fórmula da gelose fosse $(C_6H_{10}O_5)_{57} SO_4H_2$ e Fairbothor e Martim opinam que seja antes um sal de calcio de um ester sulfurico o elemento principal, tendo por fórmula:



Para Neuberg e Ohle o agar é um ester de acido sulfurico monobasico com um atomo de enxofre e um peso molecular aproximado de 9.000.

Trabalhando com o agar retirado de 6 variedades diferentes de algas marinhas, observou Yanagigawa grandes diferenças entre as varias especies. Os elementos metalicos mais comuns são o Ca e o Mg, embora algumas especies contenham ferro e aluminio. O principal constituinte quimico é a galactose que se apresenta em combinação esterea com o acido sulfurico. Esta combinação se faria sob duas formas: $(R.OSO_2)_2M$ e $R(OSO_2O)R'$, onde R e R' são polisacarideos e M um elemento metalico. Pirie, estudando a gelose, realizou a acetilação do agar em pó, dessecado, com anhidrido acetico e acido sulfurico sob resfriamento, e subsequente aquecimento lento até 38°. A unica substancia cristalina que pode isolar desse tratamento foi a heptaacetil-dl-galactose (p. f. 132°). Após hidrolise parcial da gelose pode isolar a α -pentaacetil-d-galactose e a α -pentaacetil-dl-galactose, mas já não mais a heptaacetil-galactose. Estes resultados são compativeis com a hipótese de que no agar, pelo menos a dl-galactose não ocorre em forma ciclica, furanica ou piramica, sendo a acetilação que dá a hepaacetil-galactose realizada antes que se processe hidrolise completa. Depois da hidrolise o carbohidrato se cicliza e então já não se obtem mais o heptaacetil-galactose, só sendo isolado o pentaacetil. Podemos supor que, pelo menos em parte, pois

o teor de heptaacetilgalactose obtido é de cerca de 20%, que o fenômeno se passe da seguinte forma:



Morozov deu á gelose um peso molecular entre 5.000 e 30.000.

O agar foi valiosa conquista de bacteriologia. Admite-se *a priori* ser ele inatacado pelas bacterias, servindo como suporte nos meios nutritivos gelificados. São já numerosas as bacterias citadas na literatura dotadas de capacidade de se aproveitar da gelose como meio nutritivo. Em 1902, foi descrito por Gran pela primeira vez, uma bacteria isolada da agua do mar nas costas da Noruega, a que denominou *Bacillus gelaticus*, Gran, atualmente *Pseudomonas gelatica*, Bergey *et al.* É um bastonete curto, mesofilico, anaerobio facultativo, ativamente movel e medindo $0,6 \mu$ por 3μ . Descreveu Gran 3 variedades de bacterias gelatinoliticas: var. *genuina*, var. *energica* e var. *bergensis*.

Mais tarde Panek descreveu um germen mesofilico, anaerobio facultativo, o *Bacterium betae viscosum*, que em meios sem assucar se desenvolve sob a forma de bastonete muito curto, ás vezes em cadeias, e apresentando-se em meios assucarados, principalmente com sacarose, em bastões maiores. Nestes meios a bacteria forma grande quantidade de mucilagem. Em agar com sacarose as colonias são circulares e gradualmente coalescem tornando-se achatadas ou concavas, com 0,5 a 1 cm. de diametro. A liquefação do agar é particularmente notavel quando é semeado em estria; ahi o meio se torna tão amolecido que cae ao fundo do tubo.

Biernachi descreveu tambem um bastonete, igualmente mesofilico e anaerobio facultativo, o *Achromobacter Nenckii*, Bergey *et al.* (*Bacterium Nenckii*, Biern.).

Northrup refere-se tambem a um germen que isolou da terra, crescendo muito lentamente em anaerobiose á superficie do agar e capaz de liquefaze-lo.

Em 1925 Aoi isolou de monte de palha de arroz em decomposição e do sólo, nas vizinhanças de seu laboratorio, um germen decompondo energicamente o agar, associado com bacterias celulosoliticas. É um bastonete de $0,7$ por 2 a 3μ , encurvado, que supoz ser um vibrião. Semeado em agar, por picada em camada alta, dá fusão fundibular; em estria as colonias se tornam gradualmente côr de palha e o agar liquefeito se acumula no fundo do tubo, mostrando acentuada ação redutora sobre o liquido de Fehling.

Posteriormente Aoi e Orikura redescreveram este germen, denominando-o então *Vibrio andoi*, Aoi e Orik.

Gray e Chalmers tambem isolaram do sólo um microorganismo que liquefaz o agar, denominado por eles *Microspira agar-liquefaciens*, bastonete curto, encurvado, muitas vezes se assemelhando a coco. Movel, aerobico, decompõe o agar na ausencia de outros hidratos de carbono mais facilmente atacaveis. Ataca tambem energicamente a cellulose em

meio liquido, em contacto com o ar. É o *Vibrio agar-liquefaciens* (Gray e Chalmers) Bergey *et al.*

É razoavel supor que entre as bacterias do mar sejam encontradas muitas especies capazes de decompor o agar. Sendo ele proveniente de algas marinhas, estas, quando mortas, devem ser decompostas pelas bacterias da agua do mar. Talvez por isso Lundestad poude isolar da agua do mar muitas bacterias decomponedoras do agar. Assim, descreve uma quarta variedade do *B. gelaticus*, de Gran, a var. *fluorescens*, que dá pigmento verde no meio de cultura agar-peixe. Isolou da agua do mar de Dröbak, os *B. droebachense*, o *B. Granii*, *B. rhodomelae*, *B. polysiphoniae*, *B. delesseriae*, os *B. ceramicola*, e ainda de agua do mar, mas em Bjönsund, o *B. boreale* (quasi todos incluidos hoje no genero *Flavobacterium*, Bergey *et al.*).

Waksman e Bavendamm isolaram do sedimento de agua do mar, perto da ilha Williams, nas ilhas Bahamas, um germen que ataca rapidamente o complexo hemicelulosico do agar e o utiliza como fonte de energia. Grande parte do carbono é libertado como CO₂ e parte empregada para a sintese da substancia celular. Necessita esta bacteria, para seu desenvolvimento, outra fonte de nitrogenio, pois o N do agar não é utilizado com facilidade. Verificaram mais ser o N dos nitratos muito melhor fonte de energia que o dos saes amoniacaes.

Goresline descreve tres novas bacterias que podem liquefazer o agar: o *Achromobacter pastinator*, o *Pseudomonas lacunogenes* e o *P. segne*.

Nichols descreve tambem um germen que isolou da terra e que liquefaz o agar. Anaerobio facultativo, cresce melhor em aerobiose. Não deu nome especial ao germen, que não se assemelha a nenhum dos até então descritos, a não ser do *Bac. gelaticus*, var. *bergensis* de Gran, pois a descrição incompleta deste não permite individualização nem distinção perfeita do *B. gelaticus*.

A maioria das bacterias acima referidas têm como *habitat*, ou o sedimento marinho, ou a terra, e ficam proximos dos germens de decomposição dos detritos vegetaes, formadores de *humus*, as bacterias celulosolíticas, pectinolíticas, lignolíticas e outras degradadoras de materia vegetal.

As bacterias gelolíticas levam o ataque da gelose a uma degradação muito grande, chegando, como vimos, a provocar liquefação do agar do meio.

Muitos outros germens, entretanto, são capazes de produzir citases ou enzimas capazes de hidrolizar hemiceluloses, sem que o ataque seja tão intenso. Waksman e Diehm fazem estudo detalhado sobre a capacidade dos germens em decompor varias hemiceluloses. Observaram, por

exemplo, que a galactana, produto obtido por eles do musgo irlandez (*Chondrus crispus*), de composição semelhante á do agar, foi mais resistente á decomposição pelos micro-organismos que outras hemiceluloses então ensaiadas, a manana e a xilana.

Os cogumelos, especialmente os phycomycetos, atacaram as hemiceluloses utilizadas por Waksman e Diehm, causando desprendimento de CO₂ e pequenas quantidades de acidos organicos. Comparando o teôr da decomposição da hemicelulose pelo computo da quantidade de CO₂ desprendida, observaram esses pesquisadores ser o ataque pelos cogumelos mais ativo no inicio do periodo de incubação, diminuindo essa producção com a evolução da cultura, após uma semana. Os *Actinomyces*, no inicio decomponedores mais lentos das hemiceluloses que os demais fungos, apresentaram, no entanto, ação mais uniforme no correr do tempo, terminando por se tornarem decomponedores mais energicos.

Com bacterias do solo observaram Waksman e Diehm ataque constante das hemiceluloses, com grande numero de germens aerobios ou anaerobios. Sob ação dessas bacterias foi a galactana a hemicelulose mais difficilmente atacavel.

A purificação quimica pareceu-lhes tornar as hemiceluloses mais resistentes á decomposição, especialmente pelas bacterias anaerobias. Ha na decomposição das hemiceluloses produção de acidos organicos — acido butirico, propionico, acetico e outros, além de varios gazes, principalmente sob ação dos germens anaerobios: H₂, CH₄, CO₂. A observação de serem diversos os acidos e gazes obtidos no final da decomposição e variaveis as respectivas quantidades, mostra serem tambem diversos os processos quimicos realizados pelos diferentes microorganismos nesse trabalho.

E' muito importante a observação que fizeram eles da pequena especificidade dos varios microorganismos no ataque ás varias hemiceluloses, muito menor que dos germens celulosolíticos em relação á cellulose, embora mostrem esses microorganismos certa preferencia por determinadas hemiceluloses. A decomposição das hemiceluloses mais comuns, xilanas e outras pentosanas e mananas, não é limitada a um grupo especial ou a algumas especies de bacterias ou cogumelos.

E' facil supor que não são apenas os microorganismos banais da agua e do sólo os unicos capazes de realizar a decomposição de hemiceluloses; resultados semelhantes se iriam obter com germens pathogenicos ou não, encontrados habitualmente nos seres organizados.

De nossas observações mostraram-se muito ativos decomponedores os germens da flora do intestino de cavalo, e, de modo geral, a maioria dos germens anaerobios é capaz de crescer em meios com alguns sais

no qual a unica fonte de carbono foi a gelose. O ataque, é obvio, é pequeno, e um pouco irregular, mas suficientemente nitido.

Decomposição do agar pelos anaerobios

Germens	CO ₂ cc. p. 100 cc.	Acidez	
		Na OHn/10 cc. p. 100 cc.	em ac. latico mgrs. por 100 cc.
<i>Cl. histolyticum</i> (Cl. 105)	2,78	3,20	28,8
<i>Cl. histolyticum</i> (Cl. 100)	0,56	0	0
<i>Cl. tetani</i> (Cl. 232)	8,70	0	0
<i>Cl. tetani</i> (Cl. 240)	0	0,10	0,9
<i>Cl. perfingens</i> (Cl. 5)	5,93	3,40	30,6
<i>Cl. septicum</i> (Cl. 50)	0,37	0,40	3,6
<i>Cl. Novyi</i> (Cl. 160)	0,93	0,50	4,5
Fezes de cavalo (1)	24,45	5,70	51,3
Fezes de cavalo (2)	26,18	2,50	22,5

Leitura após 72 horas a 37 C, num meio mineral com 0,25 o/o de agar.

DISCUSSÃO

Não é somente importante saber da existencia frequente de bacterias celulosolíticas no sólo e na agua, cujo papel na decomposição das hemiceluloses dispensa encarecimento para a agricultura. Waksman e Diehm encontraram decomposição das hemiceluloses, as quais incluem a gelose, no teôr de 3 a quasi 30%, entre 34 amostras de plantas, humus ou restos vegetais examinados, e de pentoses na maioria das 34 amostras de plantas, por germens mais diversos. Viram eles que o prolongamento da ação no tempo amplia consideravelmente a decomposição das pentosanas e que a junção de certos nutrientes inorganicos como CaCO₃, fosfato de amonio e KCl favoreciam consideravelmente a decomposição das hemiceluloses, de 30% ou mais.

O assunto se nos mostrou relevante na pratica bacteriologica quando tentamos estudar a fermentação dos anaerobios no meio semi-solido proposto por Spray e noutro meio do mesmo tipo por nós usado desde muito. Spray já notara acidificação do tubo de meio de contra-prova sem lhe ter dado explicação, e procura obviar a dificuldade fazendo a leitura dos tubos com assucares em comparação com tubos tes-

temunhas. Adeante mostraremos os inconvenientes de uma tal pratica na leitura dos resultados das provas de fermentação com o meio Spray. Por ora nos limitaremos a assinalar que ha acidificação dos meios de fermentação ordinariamente usados com as bacterias anaerobias quando estes contêm proteínas e, uma vez por outra, estas e mais agar. Em relação ás proteínas, Pacheco e Araujo Costa mostraram recentemente que no processo de desaminação da molecula proteica pelos anaerobios geram-se acidos diversos, capazes de abaixar *per se* o pH do meio com eles semeados, independente da fermentação dos assucares e concorrentes com esta. A demonstração ora realisada, da fermentação da gelose pelas bacterias anaerobias, veio complicar mais a execução de provas de fermentação para especificação dessas bacterias na sua analise bacteriologica, quando se utiliza o agar para tornar os meios semi-solidos e facilitar a prova de fermentação com dispensa de aparelhos ou com artificios de anaerobiose.

Não admira a verificação da hidrólise da gelose pelos anaerobios do genero *Clostridium*, sabendo-se que essas bacterias fazem parte da flora normal das aguas, e principalmente do sólo, onde tantos pesquisadores dos referidos acima encontraram numerosas, provavelmente dentre as inumeras especies gelolíticas ali existentes. E' possivel até que seja essa uma propriedade geral das bacterias do sólo, ou pelo menos pertinente a um grande numero de generos dentre os quais se incluem os clostridios.

Waksman e Diehm exprimem em mgs. a hemicelulose decomposta, exprimindo em CO₂ somente a decomposição da xilana e da manana. Nós preferimos exprimir em CO₂ os resultados, gaz sempre presente e resultante da fermentação carbohidratica. Na decomposição da xilana aqueles pesquisadores encontraram de 1,2 a 12,5 cc. (1.7 — 1.0 — 5.8 — 2.9 — 12.5 — 3.6 — 13.6 — 1.2 cc.), nas diferentes dosagens realisadas após 4 dias de incubação num meio mineral, numeros bem aproximados dos alcançados por nós tendo a gelose como fonte de carbono.

Os valores de Waksman e Diehm se acresceram consideravelmente com o tempo e certamente o mesmo nos sucederia si porventura nos interessasse a capacidade total da decomposição da gelose. Mas cuidavamos unicamente de verificar a existencia do ataque desse corpo por aquelas bacterias dentro de curto tempo, uma vez que não se prolonga a incubação por espaço de tempo superior a 4 dias para as provas de fermentação dos assucares com os anaerobios. Numeros analogos encontraram ainda Waksman e Diehm com a decomposição da manana naquele praso de tempo, expressos ainda em CO₂. As presentes verificações demonstraram a existencia de acidificações sempre encontradas por

Spray nos tubos com seu meio, independente da fermentação em meios não adicionados de assucar. Por outro lado, nos meios minerais sem gelose, os clostrídios não se desenvolvem, o que torna extremamente complexa e falha a realização da prova de fermentação de anaeróbios.

As provas da fermentação no meio de Spray apresenta outros inconvenientes. Ele propõe, á vista da acidificação espontânea do meio cuja interpretação não é dada, uma prova em branco, com a cultura do germen no mesmo meio, sem adição do assucar. Aqui aparecem dois inconvenientes — o germen atacando o assucar do meio preferirá este á gelose e então a indicação da acidez ficará aquém da real, ou o germen não ataca o assucar mas pode atacar o agar e a fermentação encontrada também não exprime a realidade.

Nas nossas provas utilizamos amostras sacarolíticas como *Cl. Welchii* ou não sacarolíticas, como o *Cl. tetani*, tendo as primeiras decomposto o agar mais intensamente que as não sacarolíticas.

SUMMARY

1 — Anaerobic bacteria of the *Clostridium* genus acidify mineral media without sugars when agar is added.

2 — Acidulation results from the attack on the agar as a source of carbon.

3 — The quantity of CO₂ produced by the decomposition of the agar is approximately that obtained with soil bacteria as shown by Waksman and Diehm working with hemicelluloses. Although galactone is less attacked than the other hemicelluloses the acidity produced is sufficient to disturb the fermentation tests in semi-solid media with agar.

4 — The acidulation of Spray's sugar-free control medium is probably due to the decomposition of the agar by anaerobes. The acidity produced may interfere with the acidity of the fermentation of the sugar in Spray's test or may be added to it, thus giving a false indication of the real acidity.

BIBLIOGRAFIA

Aoi, K.

1925. Zbl. Bakt., II, **63** : 30.

Aoi, K. & Orikura, J.

1928. Zbl. Bakt., II, **74** : 321.

BERGEY & AL.

1939. Manual of det. Bacteriology, 5 ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co.

BIERNACKI, W.

1911. Zbl. Bakt., II, **29** : 166.

FAIRBROTHER, F. & MARTIN, H.

1923. J. Chem. Soc., **123** : 1412.

FRERICHS, G., ARENDS, G. & ZÖRNIG, H.

1925. Hagers Handb. d. Pharm. Praxis, Erster Band, Berlin, J. Springer.

GOESLINE, H. E.

1932. Science, **76** : 255 e J. Bact. (1933), **26** : 435.

GRAN, H. H.

1902. Bergens Museum Aarbog, **2** : 1. Apud Thaysen, A. C. e Bunker H. J. — The Microb. cellulose, hemiceluloses, pectins and gums (1927), Oxford Un. Press.

GRAY, P. H. H. & CHALMERS, C. H.

1924. Ann. App. Biology, **11** : 324.

LUNDESTAD

1928. Zbl. Bakt., II, **75** : 321.

MOROZOV, A.

1935. Colloid J., **1** : 37 (apud, Ch. Abs. (1936), **30** : 7968.

NEUBERG, C. & OHLE, H.

1931. Bioch. Z., **125** : 311.

NICHOLS, A. A.

1933. Zbl. Bakt., II, **88** : 177.

NORTHRUP, Z.

1919. Abs. Bact., **3** : 7.

PACHECO, G. & ARAUJO COSTA, G.

1939. Brasil Medico, **22** : 574.

PIRIE, N. W.

1936. Bioch. J., **30** : 369.

SAMEC & SSAJEVIC, V.

1921. C. r. Ac. Sc., **173** : 1474.

SPRAY, B. S.

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

WAKSMAN, S. A. & BAVENDAMM, W.

1931. *J. Bact.*, **22** : 91.

WAKSMAN, S. A. & DIEHM, R. A.

1931. *Soil Sc.*, **32** : 73-97-119.

YANAGIGAWA, T.

1933. *Rept. Imp. Ind. Res. Inst., Osaka*, **14** : 1 (apud *Ch. Abst.* (1936),
30 : 3541.
