

# ESTUDO DE ALGUNS FATORES CONDICIONANTES DA FIXAÇÃO ESPECÍFICA DE LEVEDURAS PSICROFÓBICAS EM HOSPEDEIROS ANIMAIS<sup>1</sup>

L. L. LEON & L. R. TRAVASSOS\*

**SUMÁRIO:** Utilizando-se 3 amostras de leveduras psicrófólicas: *Torulopsis pintolopesii*, *Torulopsis bovina* e *Candida slooffii* foram realizadas experiências visando a determinação dos possíveis fatores condicionantes da especificidade destas leveduras para determinados hospedeiros. Estes fatores parecem estar relacionados às exigências nutritivas das amostras, apresentando interesse no estudo da associação ecológica.

Não foram detectados fatores estomacais determinantes da especificidade para o hospedeiro, observada em algumas amostras, embora não estejam excluídos fatores nutricionais presentes em áreas mais distais do trato digestivo. Alguns resultados sobre a viabilidade de leveduras em presença de soros animais sugerem que fatores séricos podem ser importantes na fixação de microrganismos nos animais hospedeiros.

**T**RAVASSOS e Cury (1971) estudaram a biologia de um grupo de leveduras termófilas (psicrófólicas) originalmente descritas por VAN UDEN e cols. como saprófitas obrigatórias de animais de sangue quente. Dentre as espécies consideradas, incluem-se: *Torulopsis pintolopesii*, encontrada no trato digestivo de ratos e outros pequenos roedores; *Candida slooffii* isolada de cavalos e porcos e *Torulopsis bovina*, apresentando eletividade para o gado bovino e para o trato intestinal de porcos.

Tendo em vista que a especificidade para o hospedeiro, está aparentemente relacionada com as exigências nutritivas, o estudo deste grupo de leveduras assume interesse todo especial na compreensão da associação ecológica. As principais características nutricionais e bioquímicas importantes para a caracterização das diversas espécies são:

*Candida slooffii* – incapacidade de utilização de ácido glutâmico como única fonte de N; inibição pelo ácido glutâmico e reversão pelo

ácido aspártico; sensibilidade à associação citratometais; inibição pela colina a 37°C e exigência de colina, leucina e metais a 43°C; exigência de inositol e outras vitaminas do complexo B (Travassos e Mendonça, 1972; Roitman et al, 1969).

*Torulopsis pintolopesii* – exigência de colina, incapacidade de incorporação de colina exógena em lecitina e excreção de produtos resultantes do metabolismo de colina (Cruz e Travassos, 1970).

*Torulopsis bovina* – exigência de colina e carnitina; síntese deprimida de ergosterol e outros esteróis metilados; incapacidade de retenção de carnitina formada endogenamente (Travassos & Sales, 1974; Lima et al, 1970).

No presente trabalho são investigados possíveis fatores condicionantes da seletividade na distribuição ecológica destes microrganismos.

Tomando como exemplo, *T. pintolopesii* e observando sua incidência no aparelho digestivo

<sup>1</sup> Entregue para publicação em 9 de setembro de 1974.

\* Departamento de Microbiologia e Imunologia da FIOCRUZ e Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia da UFRJ, com o auxílio do CNPq.

de camundongos, é possível estudar através de técnicas adequadas, alguns dos fatores que condicionariam a maior incidência de *T. pintolopesii* nestes animais, bem como a exclusão de outras leveduras.

As relações entre estas leveduras psicrófóbicas e os hospedeiros poderiam ser estudadas igualmente do ponto de vista imunológico, sendo que uma possibilidade de exclusão da flora heteróloga seria a presença de anticorpos naturais contra determinados tipos de saprófitas obrigatórios.

O equilíbrio biológico, determinado possivelmente pelas inter-relações bioquímicas entre microrganismos e destes com seus hospedeiros naturais, deve ser um fator decisivo no estabelecimento de uma especificidade da flora leveduriforme para cada hospedeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras utilizadas: *Candida slooffii* n.º 2419, *Torulopsis pintolopesii* n.º 3084 e *Torulopsis bovina* n.º 2778, recebidas do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

*Meio de cultura* – para a manutenção das amostras, foram feitos repiques quinzenais, exceto para *C. slooffii*, para a qual foram feitos repiques mensais, utilizando-se o seguinte meio (g%):

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Peptona .....             | 1,0 |
| Extrato de levedura ..... | 0,5 |
| Glicose .....             | 2,0 |
| Agar .....                | 1,5 |
| pH 6,5                    |     |

Incubação: 37°C/24 horas.

Para as experiências de crescimento foi utilizado o seguinte meio sintético (g%):

|  |          |
|--|----------|
| Glicose .....                              | 2,0      |
| L-asparagina .....                         | 0,1      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....      | 0,05     |
| Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O ..... | 0,05     |
| NaCl .....                                 | 0,01     |
| Biotina .....                              | 0,000002 |
| Pantotenato de cálcio .....                | 0,2      |
| Tiamina HCl .....                          | 0,2      |
| Piridoxina HCl .....                       | 0,2      |
| Ac. nicotínico .....                       | 0,2      |
| Inositol .....                             | 0,001    |

*Preparo de inóculo* – Em todas as experiências, o inóculo foi preparado a partir de culturas crescidas a 37°C/24 h, no meio de manutenção. A suspensão para o inóculo foi preparada em solução fisiológica e uma gota de pipeta Pasteur foi inoculada nos diversos sistemas.

*Preparo do material* – Nas experiências com as frações estomacais, foram utilizados camundongos da mesma raça, pesos aproximados e que haviam recebido dieta normal.

Após necrópsia, foi retirado o estômago e separadas as partes glandular (secretora) e não glandular (não secretora). Destas duas partes foram tomadas as porções referentes ao extrato, lavagem e conteúdo do “saco” estomacal, às quais foram adicionadas ao meio sintético em diferentes concentrações. Após incubação a 37°C/48 horas foi observado o crescimento, através leituras em fotocolorímetro Klett-Summerson (540 mμ).

Para a avaliação da viabilidade, foram também utilizadas as frações estomacais já citadas, recolhidas em líquido de Ringer. Destes sistemas eram retiradas as amostras para plaqueamento em meio de manutenção em diferentes espaços de tempo, a saber: 0, 1, 3 e 24 horas. Estas placas eram também incubadas a 37°C/48 h, após o que foi feita a contagem das colônias.

Nas experiências, visando o estudo de anticorpos eventualmente impeditivos, do desenvolvimento de microrganismos, foram elaborados sistemas com meio sintético adicionado de diversos soros em diluições de 1:500; soro de cavalo, camundongo, rato, coelho, cobaio e carneiro. Após incubação (37°C/48 h) foram feitas leituras de crescimento. Paralelamente também foram feitas placas para contagem de colônias e avaliação de viabilidade das amostras em presença dos diferentes soros, da mesma forma descrita anteriormente.

## RESULTADOS

Conforme pode ser observado nos gráficos, os materiais ensaiados estimulam o crescimento das amostras utilizadas em meios de cultura adequados indicando que, se existem inibidores metabólicos estes não podem ser demonstrados quando adicionados juntamente com o restante de substâncias presentes nos materiais originários do estômago e do meio de cultura. Aparentemente não se estabeleceram condições de “imbalance” nutricional (Travassos e Mendonça, 1972) para o qual *C. slooffii* mas não *T. pintolopesii* é sensível.

As curvas de viabilidade foram feitas levando em conta a proveniência do material, se da parte secretora ou não secretora do estômago. Os resultados mostraram que suspensões em líquido de Ringer tornavam-se inviáveis mais rapidamente na presença dos materiais ensaiados do que nos controles. Contudo o grau de inativação foi igualmente intenso em todas as amostras

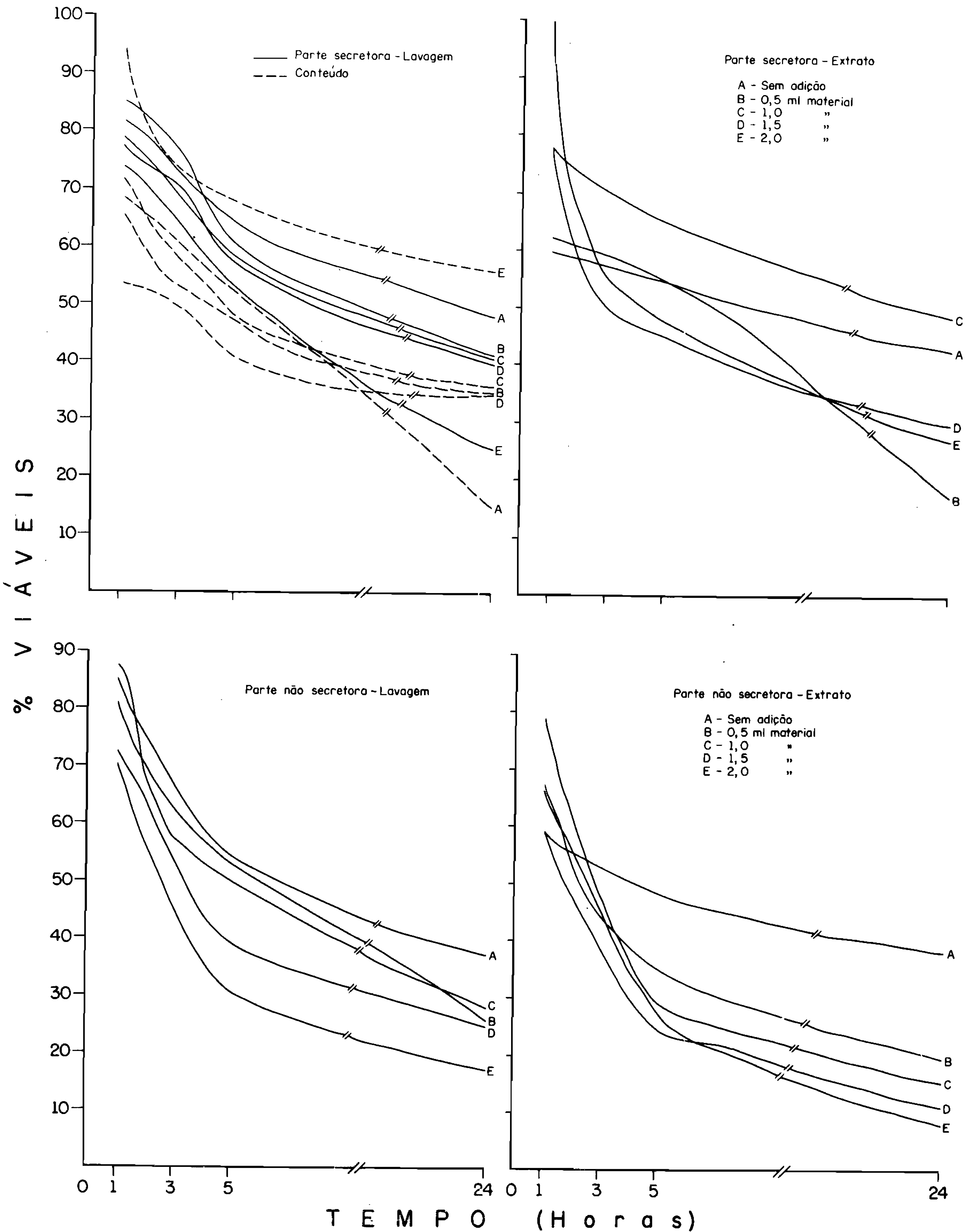
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE DIFERENTES SOROS  
(Leituras em Unidades Klett)

| AMOSTRAS                  | 2778 | 3084 | 2419 |
|---------------------------|------|------|------|
| <b>Soro de cavalo</b>     |      |      |      |
| S/adição                  | 165  | 170  | 140  |
| 0,1ml                     | 165  | 235  | 140  |
| 0,2ml                     | 175  | 240  | 140  |
| 0,5ml                     | 180  | 240  | 160  |
| 1,0ml                     | 200  | 245  | 170  |
| 2,5ml                     | 240  | 250  | 200  |
| <b>Soro de camundongo</b> |      |      |      |
| S/adição                  | 170  | 186  | 110  |
| 0,1ml                     | 160  | 204  | 125  |
| 0,2ml                     | 165  | 194  | 117  |
| 0,5ml                     | 170  | 200  | 124  |
| 1,0ml                     | 176  | 204  | 140  |
| 2,5ml                     | 180  | 201  | 180  |
| <b>Soro de rato</b>       |      |      |      |
| S/adição                  | 237  | 206  | 210  |
| 0,1ml                     | 210  | 214  | 203  |
| 0,2ml                     | 191  | 210  | 215  |
| 0,5ml                     | 194  | 213  | 272  |
| 1,0ml                     | 185  | 200  | 221  |
| 2,5ml                     | 143  | 153  | 163  |
| <b>Soro de cobaio</b>     |      |      |      |
| S/adição                  | 234  | 216  | 200  |
| 0,1ml                     | 200  | 198  | 203  |
| 0,2ml                     | 204  | 220  | 198  |
| 0,5ml                     | 210  | 202  | 230  |
| 1,0ml                     | 172  | 203  | 223  |
| 2,5ml                     | 154  | 164  | 168  |
| <b>Soro de coelho</b>     |      |      |      |
| S/adição                  | 160  | 150  | 115  |
| 0,1ml                     | 125  | 210  | 110  |
| 0,2ml                     | 168  | 208  | 108  |
| 0,5ml                     | 180  | 210  | 102  |
| 1,0ml                     | 194  | 155  | 118  |
| 2,5ml                     | 145  | 135  | 135  |
| <b>Soro de carneiro</b>   |      |      |      |
| S/adição                  | 150  | 180  | 118  |
| 0,1ml                     | 160  | 168  | 141  |
| 0,2ml                     | 180  | 172  | 126  |
| 0,5ml                     | 140  | 202  | 131  |
| 1,0ml                     | 152  | 198  | 124  |
| 2,5ml                     | 135  | 148  | 132  |

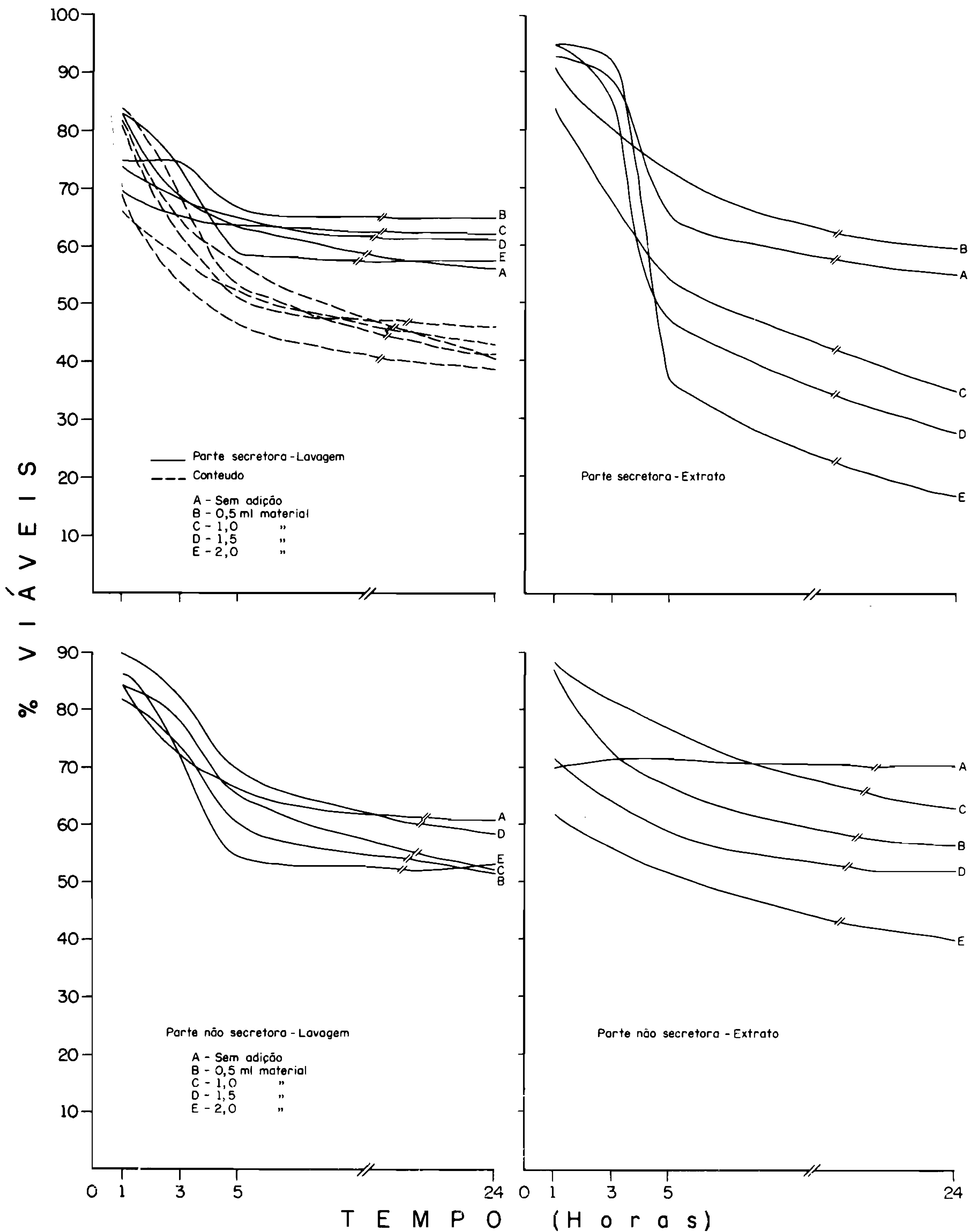
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE EM PRESENÇA DE DIFERENTES SOROS (% DE VIÁVEIS)

| TEMPO              | 1h   |      |      | 3h   |      |      | 24h  |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| AMOSTRAS           | 3084 | 2419 | 2778 | 3084 | 2419 | 2778 | 3084 | 2419 | 2778 |
| Soro de cavalo     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Sem adição         | 90   | 84   | 87   | 66   | 66   | 73   | 8    | 38   | 10   |
| 0,2ml              | 76   | 92   | 95   | 53   | 31   | 88   | 12   | 56   | 10   |
| 0,5ml              | 89   | 46   | 74   | 61   | 26   | 69   | 19   | 21   | 8    |
| 1,0ml              | 96   | 66   | 94   | 79   | 57   | 90   | 9    | 30   | 37   |
| Soro de camundongo |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Sem adição         | 82   | 71   | 72   | 42   | 49   | 62   | 38   | 21   | 12   |
| 0,2ml              | 92   | 73   | 85   | 74   | 59   | 59   | 44   | 25   | 16   |
| 0,5ml              | 98   | 45   | 90   | 98   | 34   | 74   | 41   | 25   | 31   |
| 1,0ml              | 80   | 93   | 96   | 63   | 55   | 85   | 23   | 19   | 32   |
| Soro de coelho     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Sem adição         | 91   | 47   | 56   | 85   | 43   | 72   | 48   | 31   | 35   |
| 0,2ml              | 66   | 68   | 54   | 41   | 52   | 62   | 35   | 36   | 42   |
| 0,5ml              | 71   | 70   | 45   | 47   | 57   | 48   | 30   | 29   | 32   |
| 1,0ml              | 79   | 71   | 54   | 49   | 57   | 48   | 20   | 28   | 21   |
| Soro de cobaio     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Sem adição         | 86   | 94   | 87   | 67   | 82   | 81   | 55   | 44   | 34   |
| 0,2ml              | 83   | 88   | 82   | 69   | 72   | 66   | 56   | 37   | 32   |
| 0,5ml              | 83   | 80   | 80   | 71   | 69   | 72   | 56   | 32   | 37   |
| 1,0ml              | 80   | 64   | 98   | 69   | 76   | 69   | 60   | 30   | 36   |
| Soro de carneiro   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Sem adição         | 73   | 83   | 79   | 71   | 39   | 68   | 68   | 25   | 47   |
| 0,2ml              | 57   | 77   | 82   | 55   | 36   | 76   | 54   | 19   | 53   |
| 0,5ml              | 55   | 72   | 87   | 50   | 35   | 82   | 47   | 18   | 49   |
| 1,0ml              | 71   | 70   | 75   | 56   | 46   | 69   | 38   | 28   | 45   |
| Soro de rato       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Sem adição         | 76   | 82   | 90   | 61   | 80   | 80   | 38   | 37   | 30   |
| 0,2ml              | 73   | 78   | 91   | 88   | 60   | 90   | 38   | 33   | 28   |
| 0,5ml              | 76   | 86   | 67   | 71   | 64   | 86   | 35   | 37   | 26   |
| 1,0ml              | 75   | 86   | 79   | 71   | 63   | 79   | 34   | 30   | 14   |

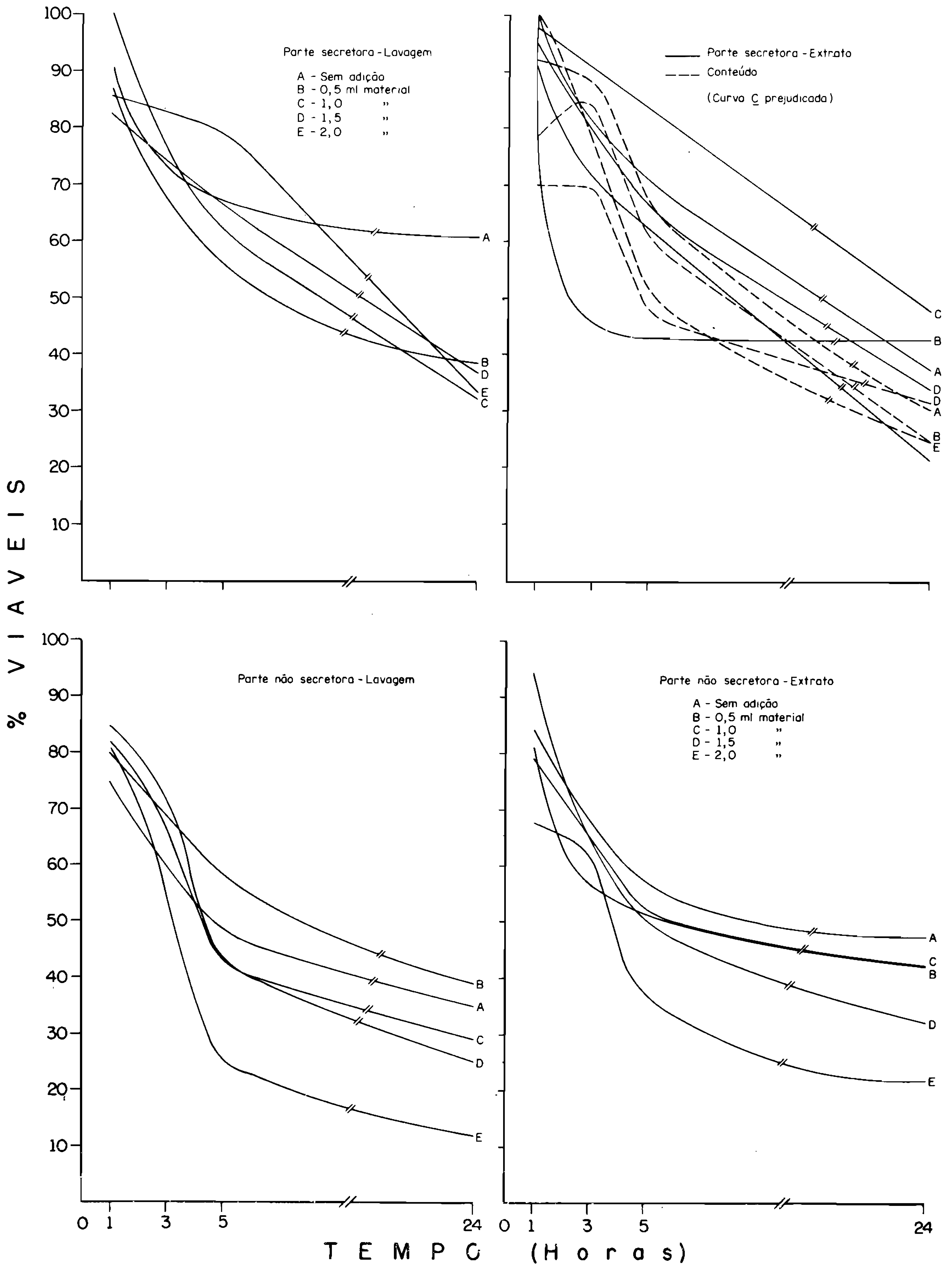
# CURVA DE VIABILIDADE - ESTÔMAGO DE CAMUNDONGO AMOSTRA 2419



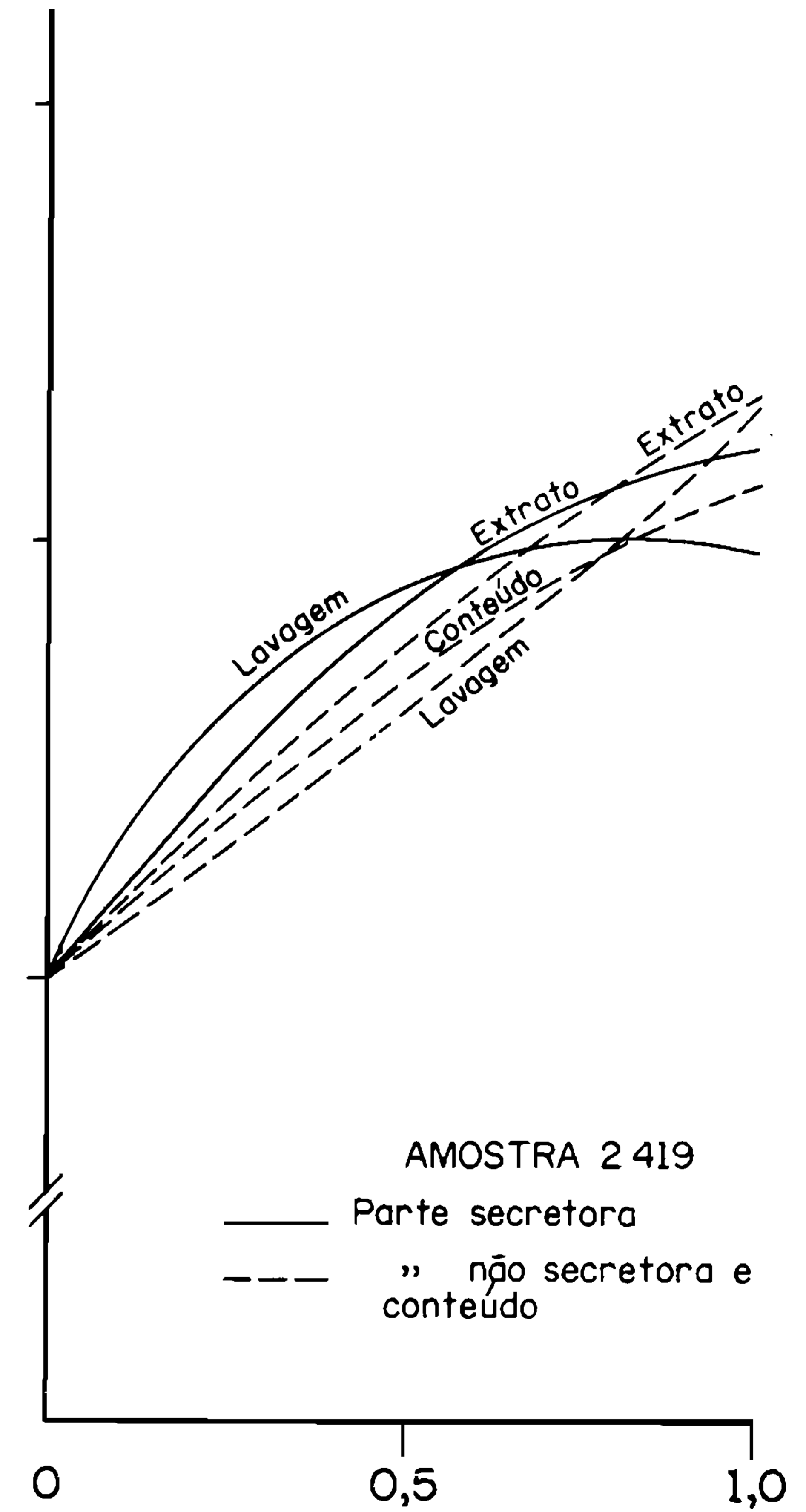
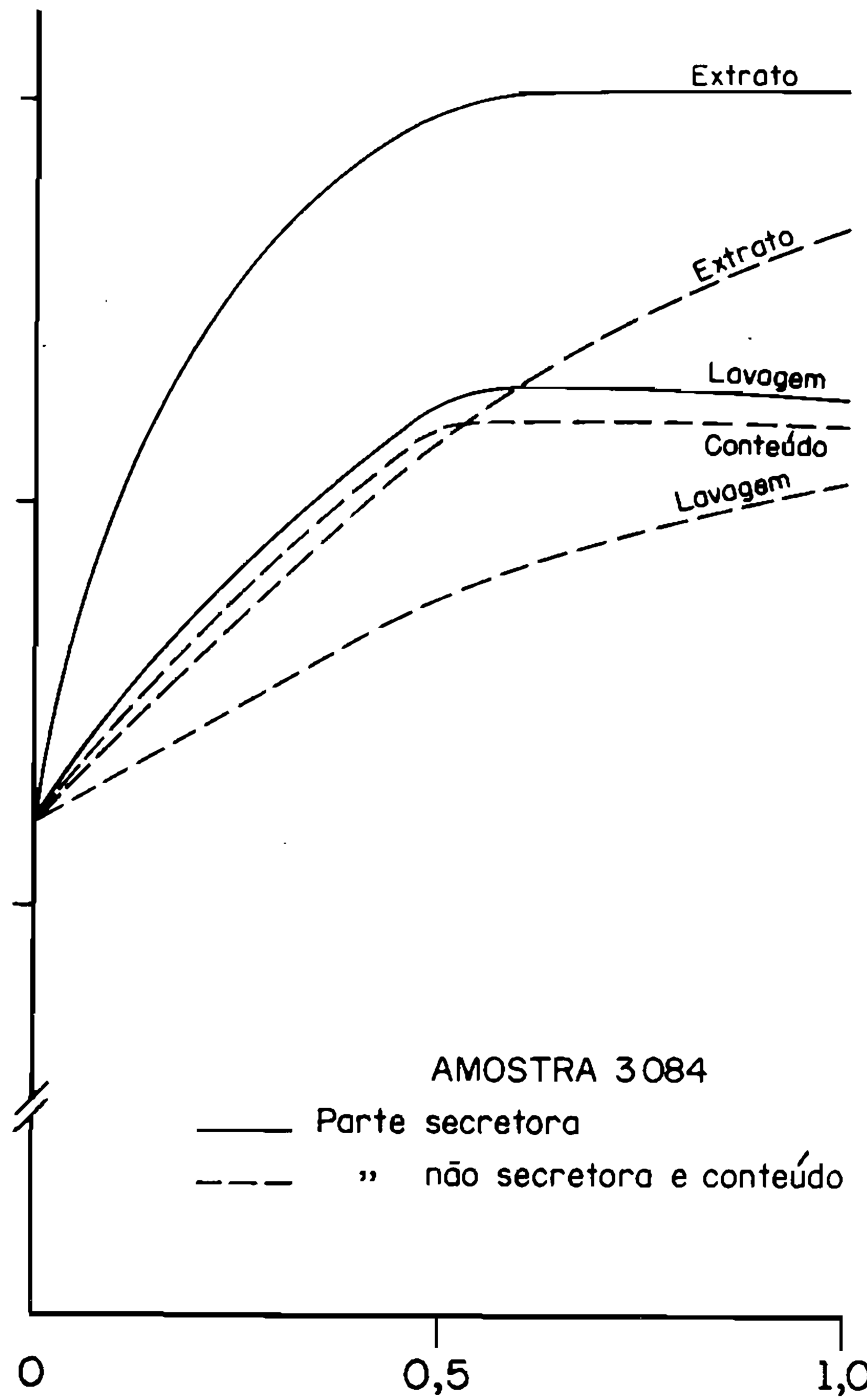
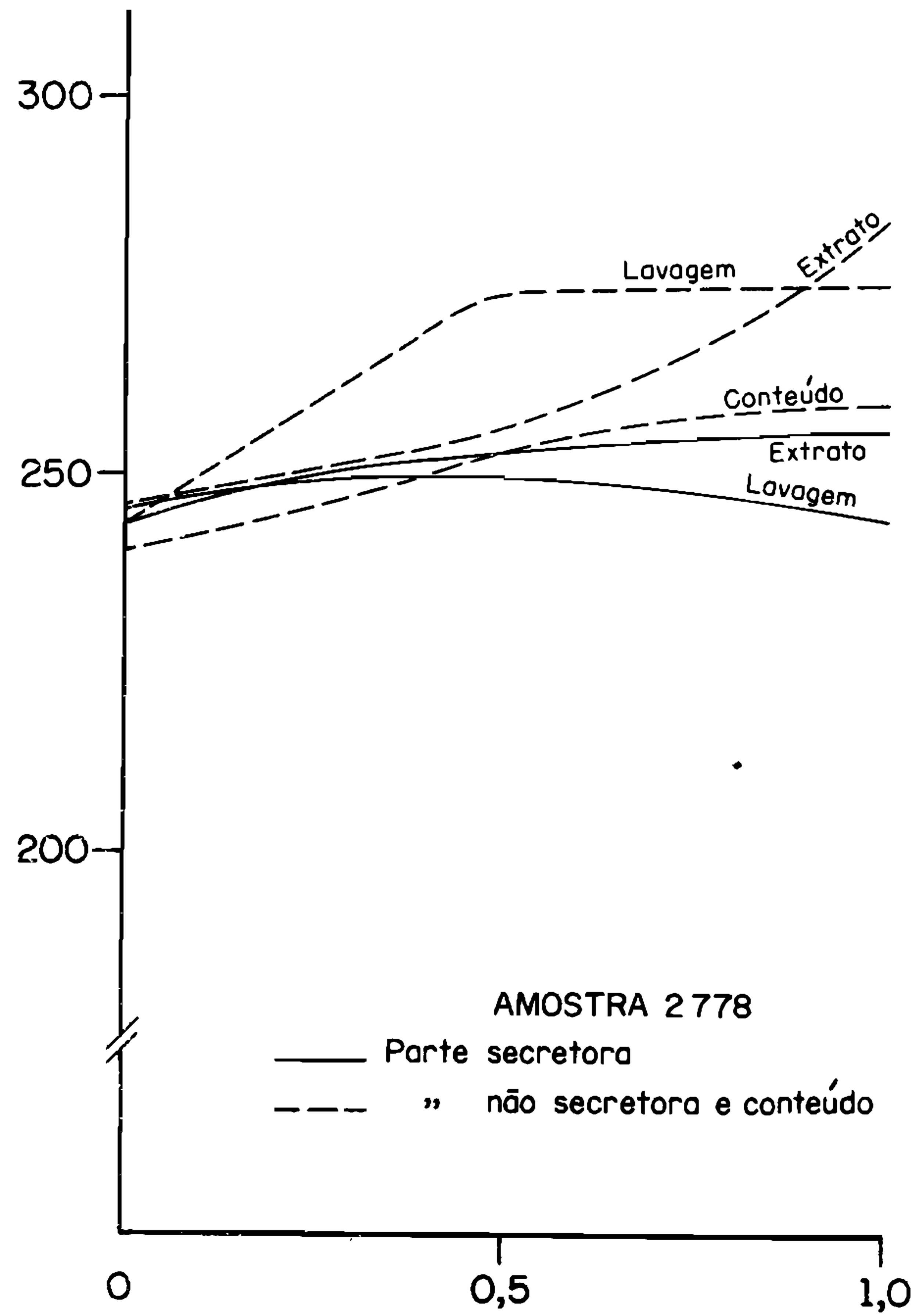
CURVA DE VIABILIDADE - ESTÔMAGO DE CAMUNDONGO  
AMOSTRA 2778



# CURVA DE VIABILIDADE - ESTÔMAGO DE CAMUNDONGO AMOSTRA 3 084



# CURVAS DE CRESCIMENTO - ESTÔMAGO DE CAMUNDONGO





de leveduras estudadas, indicando que não existe uma especificidade de ação para a levedura heteróloga (p/ex.: *C. slooffii*), em relação ao hospedeiro.

Não houve, por outro lado, diferença entre o material da parte secretora e não secretora do estômago, o que poderia ser esperado, tendo em vista as experiências de Savage sobre distribuição na mucosa, de leveduras (*T. pintolopesii*) e de *Lactobacillus* (Savage, 1970).

Estas experiências sugerem ainda que fatores outros como equilíbrio biológico sejam mais importantes na fixação ou eliminação de uma determinada levedura. Foram feitas então experiências visando a determinação da ação de anticorpos naturais contra estas amostras.

Como pode ser visto nas tabelas, o resultado das experiências com os diferentes soros, pode ser assim sintetizado:

*Soro de cavalo* — aparente inexistência de anticorpos naturais ou outros fatores contra as amostras em estudo.

*Soro de camundongo* — com *C. slooffii* houve um incremento da população proporcional à adição de soro, sugerindo a presença provável de um fator estimulante. Para as demais amostras não se verificou estímulo.

*Soro de rato* — para *T. bovina* houve uma pequena diminuição no crescimento; para *T. pintolopesii* e *C. slooffii* houve inicialmente um pequeno incremento do crescimento com baixa concentração de soro. Se considerarmos neste caso, a presença de um fator estimulante, este passa a ter seu efeito anulado ao atingir uma determinada concentração de soro.

*Soro de cobaio* — *C. slooffii* apresentou um máximo de crescimento com pequenas concentrações de soro e *T. bovina* apresentou um crescimento inversamente proporcional à adição do soro.

*Soro de coelho e de carneiro* — resultados análogos aos apresentados para soro de cobaio, isto é, aumento acentuado do crescimento com pequenas concentrações, logo seguido de uma baixa de crescimento.

## DISCUSSÃO

Não conseguimos demonstrar no presente trabalho a presença de inibidores metabólicos, nos extratos e líquidos de lavagem de estômago de várias espécies animais, que fossem ativos contra tipos de leveduras heterólogas. É possível que tal se dê em vista de fatores ecológicos presentes em outras áreas do trato digestivo animal. Se tal fosse o caso, fica excluído o estômago como primeira etapa seletiva na implantação destas leveduras. De fato, o sítio da distribuição seletiva de *C. slooffii* é o ceco de porcos e cavalos. *T. pintolopesii* é encontrada em várias áreas do trato digestivo de roedores, possivelmente sem haver preferência de localização. *T. bovina* é igualmente isolada do ceco de bovinos. Esta distribuição indica, possivelmente, que no hospedeiro normal alguma seletividade existe na localização no trato digestivo, sem ser estrita, no entanto. A preferência por determinados hospedeiros pode ser condicionada pelos fatores ambientais que estão presentes em áreas mais distais do trato digestivo. Travassos e Cury (1971) mostraram que *C. slooffii* é capaz de crescer em pH 3.0 em meio de composição química definida. Contudo, não existe evidência da presença ou não do mesmo conjunto de fatores nutricionais nos extratos de estômago, que reproduzam as condições das experiências de crescimento. É possível que fatores estomacais sejam importantes na implantação de *Saccharomyces guttulata* em coelhos, de modo seletivo. Mais remotamente, fatores estomacais seriam estimulantes da fixação de *Torulopsis glabrata* em humanos. Com relação a *C. slooffii*, *T. pintolopesii* e *T. bovina*, no entanto, não há evidência de que fatores presentes no estômago sejam condicionantes da fixação seletiva em determinados hospedeiros.

As curvas de viabilidade foram realizadas tendo em vista que a adição de extratos a meio de cultura já balanceado nutritivamente podia mascarar a presença de fatores inibidores. Embora ocorresse inibição em presença de extratos provenientes de diferentes áreas do estômago, não houve evidência de inibição seletiva.

A distribuição de leveduras do gênero *Torulopsis* sp. na mucosa do estômago animal, em-

bora não tenha sido caracterizada a espécie *T. pintolopesii*, está na dependência do balanço biológico exercido pela presença de bactérias lácticas (Savage, 1970). O balanço biológico pode ser, pois, o principal fator na fixação de leveduras psicrófóbicas em hospedeiros animais, não existindo outros fatores inibidores solúveis.

Quanto à ação de diversos soros sobre o crescimento e viabilidade de leveduras, ressalvas devem ser feitas com relação às experiências de crescimento. Não há evidência de que a presença de anticorpos específicos provoquem inibição no crescimento de leveduras em meio nutritivo complexo. Tal efeito poderá eventualmente ser provocado por outros fatores que não especificamente anticorpos. É conhecida a presença de fatores inibidores no soro de animais com atividade deletéria ao crescimento de *Candida albicans*. Não há evidência de que tais fatores sejam ativos contra leveduras psicrófóbicas.

Nas experiências de viabilidade em presença de soros, algum efeito seletivo foi observado após 24 horas de contato com os soros. Desta forma *C. slooffii* apresentava maior viabilidade em presença de soro de cavalo do que *T. pintolopesii* e *T. bovina*. Coincidentemente *C. slooffii* é um habitante comum de cavalos ao contrário de outras leveduras. As percentagens de sobrevivência em presença de soro de camundongo favorecem a amostra de *T. pintolopesii* e menos as amostras de *C. slooffii* e *T. bovina*.

Outros soros, como os de cobaia e carneiro, favorecem a amostra de *T. pintolopesii*, embora tal resultado não tenha relação com a especificidade para o hospedeiro exibida pelas diversas espécies.

Os resultados do presente trabalho mostram que fatores nutricionais estomacais não têm atividade no determinismo da ecologia das espécies estudadas. Fatores séricos podem ser importantes, embora associados a condições nutritivas locais em áreas mais distais do trato digestivo. A ausência de resultados muito definidos na separação destas amostras, em relação ao hospedeiro, está de acordo com os resultados obtidos recentemente (Mendonça-Hagler & Phaff, 1974, *em publicação*) que mostram que espécies de leveduras termófilas formam DNAs com idêntica composição de GC%, bem como

hibridizando cruzadamente com alta eficiência. É possível que apenas *C. slooffii* possa ser separada dos demais tipos tendo em vista suas propriedades nutritivas (Travassos & Mendonça, 1972).

#### SUMMARY

The psychrophobic yeasts *Torulopsis pintolopesii*, *Torulopsis bovina* and *Candida slooffii* were studied aiming at determining some of the factors important for the specificity of yeast-dwelling in certain hosts. These factors seem to be related in part to the nutritional requirements of the strains. Stimulatory or inhibitory factors extracted from the stomach of different animal species were unrelated to the specific fixation of certain yeasts in their hosts. We cannot however exclude that factors present in the more distal areas of the digestive tract are responsible for this specific fixation. Studies on the viability of yeasts in presence of animal sera suggest that serum factors may be equally important in determining the host-specificity of some psychrophobic yeasts.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - CURY, A.; SUASSUNA, E. N. & TRAVASSOS, L. R., 1960, Studies on the nutrition of thermophilic yeasts: *Torulopsis pintolopesii*, *Candida bovina* e *Saccharomyces telluris*. *An. Microbiol.* 8: 13-64.
- 2 - CRUZ, F. S.; ANGLUSTER, J. & TRAVASSOS, L. R., 1967, Resultados preliminares do estudo sobre o metabolismo de colina em *Torulopsis pintolopesii*. *An. Acad. Bras. Ciências*, 39: 336-337.
- 3 - CRUZ, F. S.; CURY, A.; A. ROITMAN, I. & TRAVASSOS, L. R., 1963, Inibição do crescimento de *Candida slooffii* por colina. *Ciência e Cultura*, 15: 289-290.
- 4 - CRUZ, F. S.; ROITMAN, I.; HUTNER, H. S.; CURY, A. & TRAVASSOS, L. R., 1964, Observações sobre a nutrição de *Candida slooffii*. *Ciência e Cultura*, 16: 207.
- 5 - LIMA, M. E.; ANGLUSTER, J. & TRAVASSOS, L. R., 1970, Ergosterol biosynthesis in psychrophobic yeasts. *Rev. Microbiol.* 1 (2): 61-69.

- 6 – MACKINNON, J. E., 1959, A yeast in the stomach of the mouse. *Mycopathol. et Mycol. Applic*, 10: 207-208.
- 7 – MENDONÇA-HAGLER, L. C. & PHAFF, J. H., 1974, Deoxyribonucleic acid (DNA) base composition and DNA/DNA hybrid formation in psychrophobic and related yeasts. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* in Press.
- 8 – MUSHIN, R. & DUBOS, R., 1965, Colonization of the mouse intestine with *Escherichia coli*. *J. Exptl. Med.*, 122 (4): 745-757.
- 9 – ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, H. P. & CURY, A., 1969, Choline, trace elements and amino acids as factors for growth of an enteric yeasts, *Candida slooffii* at 43°C. *Sabouraudia*, 7: 15-19.
- 10 – SAVAGE, D. C., 1970, Associations of indigenous microorganisms with gastrointestinal mucosal epithelia. *Am. J. Clinical Nutrition*, 23 (11): 1495-1501.
- 11 – SAVAGE, D. C. & DUBOS, R., 1967, Localization of indigenous yeast in the murine stomach. *J. Bacteriol*, 94: 1811-1816.
- 12 – SAVAGE, D. C., 1969, Microbial interference between indigenous yeast and lactobacilli in the rodent stomach. *J. Bacteriol.*, 98(3): 1278-1283.
- 13 – TRAVASSOS, L. R., 1967, Ação antimetabólica de colina e etionina em *Candida slooffii*. Ph. D. Thesis. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 14 – TRAVASSOS, L. R. & CURY, A., 1967, Nutrition and physiology of thermophilic yeasts. *An. Microbiol.*, 14: 11-35.
- 15 – TRAVASSOS, L. R. & CURY, A., 1971, Thermophilic enteric yeasts. *An. Rev. Microbiol.*, 25: 49-74.
- 16 – TRAVASSOS, L. R. & MENDONÇA, L., 1972, Vitamin requirements and induced nutritional imbalances as criteria in speciating psychrophobic yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 38: 379-389.
- 17 – TRAVASSOS, L. R. & SALES, C. O., 1974, Microbiological assay of carnitine. *Analytical Biochemistry*, 58: 485-499.
- 18 – VAN UDEN, N., 1960, The occurrence of *Candida* and others yeasts in the intestinal tracts of animals. *An. N. Y. Acad. Sci.*, 89: 59-68.
- 19 – VAN UDEN, N. & CARMO SOUZA, L., 1957, Yeasts from bovine caecum. *J. Gen. Microbiol.*, 16: 385-395.
- 20 – VAN UDEN, N.; CARMO SOUZA, L. & FARI-NHA, M., 1958, On the intestinal flora of horses, sheep, goats and *J. Gen. Microbiol.*, 19: 435-445.