

ALGUMAS NOTAS SÔBRE A SELEÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA OS GERMES DO GRUPO "LACTOBACILLUS"

EMMA DE LIMA.

Técnica de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

A escolha de um meio de cultura que satisfaça tôdas as condições favoráveis exigidas para o crescimento, cultivo, conservação, etc, de um determinado germe, requer da parte do técnico de laboratório muito critério e cautela na sua seleção.

Essa escolha torna-se ainda mais rigorosa quando se trata, como no presente caso, de se proceder a um exame de "contrôle".

Como é do conhecimento geral, os produtos chamados "acidófilos" deverão possuir grande número de germes vivos afim de estabelecer, quando ingeridos, abundante flora acidófila no intestino. Segundo Rettger¹, a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* constitue verdadeiro e importante fator na terapia acidófila. Kopelloff² diz que o tratamento pela terapia acidófila varia de acôrdo com o indivíduo e com as condições em que êle é tratado. Em geral, a dose média diária deve ser equivalente a 1.000 ml de uma cultura, contendo aproximadamente 200.000.000 de *Lactobacillus acidophilus* viáveis, por ml, podendo essa dose ser aumentada ou diminuída em alguns casos. Rettger³ informa que "The Council on Chemistry and Pharmacy, American Medical Association" (1934), estabelece que o leite acidófilo deve conter não menos de 200.000.000 de bacilos viáveis por ml, no dia da preparação, e não menos de 100.000.000 por ml na data da expiração do praso.

Ao procedermos ao exame de "contrôle" de um produto de *Lactobacillus*, devemos verificar em primeiro lugar a sua pureza, isto é, não deverá êle conter outros germes além dos mencionados no respetivo rótulo e, em segundo lugar, o número de germes vivos por ml.

Os germes do grupo *Lactobacillus* são exigentes para serem cultivados, não crescendo ou crescendo mal nos meios comuns de laboratório. A literatura sôbre o assunto é bem extensa, havendo

diversos autôres experimentado meios diferentes para o cultivo dêsses germes.

Dentre a enorme série de trabalhos publicados, podemos citar os seguintes: Kulp⁴, em trabalho bem descrito, recomenda o meio contendo sôro de leite-peptona e galactose, fazendo as diluições das culturas de acôrdo com o "Standard Methods of Milk Analysis". As placas semeadas com as diluições convenientes, eram incubadas a 37°C por 48 horas, em uma atmosfera contendo de 5 a 10% de CO₂. Em 1927, o mesmo autor⁵ estudou um meio contendo suco de tomate, fazendo cultivos comparativos com o ágar-sôro de leite-peptona galactose, concluindo pela vantagem do 1.º sôbre o 2.º, no qual havia um melhor crescimento das colônias. De acôrdo com o método, as placas eram incubadas em uma atmosfera contendo de 5 a 10% de CO₂, por 72 horas.

Mais tarde êsse mesmo pesquisador⁶ introduziu uma pequena modificação nêsse metodo, obtendo bons resultados. No mesmo ano (1932) Bachmann e Frost⁷ sugerem um meio para a determinação quantitativa em produtos contendo *Lactobacillus acidophilus*, meio êsse contendo suco de vegetais. Obtiveram os autôres bons resultados em suas experiências. Um trabalho muito interessante e bem completo é o apresentado por Sabine⁸, no qual o autor demonstra o resultado de um estudo comparativo de diversos meios de cultura, empregando 22 raças diferentes de *Lactobacillus*, de procedências diversas, acompanhado de quadros elucidativos bem discriminados.

Como vemos, a literatura é bem vasta, porém, para o nosso trabalho de laboratório, não era o bastante, pois interessava-nos mais de perto um meio de cultura que fôsse favorável não sômente ao crescimento do germe, mas que desse de modo o mais aproximado possível o número de germes vivos por ml de produto semeado.

Durante algum tempo o meio por nós empregado foi o de Sabouraud, ao qual juntávamos, no momento de usar, 10%, mais ou menos, de sôro de leite prèviamente esterilizado. Como é natural, não nos contentamos apenas com executar o nosso trabalho, esforçamo-nos sempre em melhorar a nossa técnica, afim de termos a segurança de que estamos cumprindo concenciosamente o nosso dever, procurando sanar as falhas que porventura se nos apresentem.

A dificuldade era termos em mão material abundante que facilitasse o nosso estudo. Com a entrada, porém, na secção, de maior número de amostras de produtos para exame, tivemos ocasião de poder levar avante o nosso trabalho. Empregamos em nossa experiência 4 meios de cultura diferentes, fazendo provas comparativas nas mesmas condições de temperatura, diluições, tempo de incubação, etc.

Fizemos também sementeiras comparativas em atmosfera *com e sem* dióxido de carbono. De acôrdo com o trabalho de Valley e Rettger⁹, todos os germes, mesmo os esporulados anaeróbios, necessitam de CO₂ para o início de seu crescimento, chegando alguns dêles a não crescer quando o ambiente de incubação e o meio de cultura são isentos de CO₂. Empregaram os autôres 82 amostras de diferentes germes. Verificaram também que alguns têm um limite ótimo de concentração de CO₂ para crescimento e que 0,3 a 1% favorece mais o crescimento em placa, para contagem, do que a quantidade geralmente presente na atmosfera (cêrca de 0,03%). Quando aumentavam a quantidade de CO₂ para 10 e 20%, êsses organismos não se desenvolviam.

Os meios por nós empregados foram: o de Sabouraud sôro de leite, o de M. R., que era preparado na secção de Meios de Cultura do Instituto e que estava dando bons resultados na prática, e os meios de fígado e de Farr, ambos aconselhados pela "Food and Drug Administration-Federal-Security Agency", e que eram recomendados como tentativas.

Trabalhamos com amostras tomadas de produtos de *Lactobacillus* expostos à venda no mercado, semeando um total de 128 placas. Todos os produtos estavam dentro do prazo de validade, marcado no respetivo rótulo, de acôrdo com a praxe.

Os produtos líquidos eram semeados do seguinte modo: a amostra, depois de bem agitada, era diluída em água destilada estéril, fazendo-se diluições seriadas desde 1/10 até 1/10.000.000. As placas eram semeadas em duplicata, com 1 ml das diluições desejadas, para cada tipo de meio-usado sendo uma série incubada a 37°C em uma atmosfera contendo dióxido de carbono, e outra sòmente a 37°C. Para ambas as séries o período de incubação era de 4 dias.

A contagem final era feita de acôrdo com o "Standard Methods of Milk Analysis". Para os produtos em tabletes, a se-

meadura era feita triturando-se 10 tabletes tomados de um número representativo de frascos de uma mesma amostra, em geral estéril, juntando-se depois 100 ml de água estéril, agitando-se até se obter uma suspensão uniforme. Essa mistura era depois examinada de acôrdo com o processo seguido para as culturas líquidas.

O meio de Farr compreende duas fases de preparação:

A — Preparação do sôro de leite.	
B — Sôro de leite preparado como em A. . .	500 ml.
Proteose peptona	5 grs.
Lactose	3 grs.
Dextrose	3 grs.
Sacarose	3 grs.
Gelatina	3 grs.
Ágar	15 grs.
Água	500 ml.

O meio assim preparado é distribuído em tubos de 20 X 200 e esterilizado, fundindo-se na ocasião de usar.

O meio de fígado é preparado do seguinte modo:

Fígado moído	500 grs.
Água destilada	1.000 ml.
Peptona	10 grs.
Ágar	20 grs.
Glicose	10 grs.
Fosfato dipotássico	1 gr.

Moer o fígado e juntar a água. Deixar em contato durante a noite na geladeira. Aquecer a vapor fluente 1 hora. Coar em pano e completar o volume para 1.000 ml. Juntar a peptona e ajustar ao pH 6.3. Juntar a glicose, o fosfato e o ágar. Fundir a 121°C, por 20 minutos. Filtrar em algodão. Distribuir 15 ml, mais ou menos, em tubos de 20 X 200. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Usar do mesmo modo que o meio de Farr.

Os resultados obtidos são fornecidos no quadro que se segue:

N.º	TEMP.	DILUIÇÕES	M E I O S				
			FARR	M. R.	FIGADO	SABOURAUD	OBSERV.
1	37°C,	1/ 100.000	Não cresceu	1 colônia	Não cresceu	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 1.000.000	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 10.000.000	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	2 colônias	1 colônia	Não cresceu	Não cresceu	Com CO2
"	"	1! 1.000.000	1 colônia	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Com CO2
"	"	1/ 10.000.000	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu	Com CO2
2	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 10.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 1.000.000	665 colônias	572 colônias	587 colônias	575 colônias	Sem CO2
"	"	1/ 10.000.000	70 colônias	67 colônias	45 colônias	61 colônias	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 1.000.000	710 colônias	680 colônias	620 colônias	571 colônias	Com CO2
"	"	1/ 10.000.000	93 colônias	66 colônias	44 colônias	60 colônias	Com CO2
3	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 10.000	300 colônias	160 colônias	221 colônias	237 colônias	Sem CO2
"	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000	362 colônias	167 colônias	291 colônias	255 colônias	Com CO2
4	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 10.000	240 colônias	200 colônias	210 colônias	190 colônias	Sem CO2
"	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000	480 colônias	300 colônias	280 colônias	290 colônias	Com CO2
5	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 10.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Sem CO2
"	"	1/ 1.000.000	45 colônias	20 colônias	26 colônias	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 10.000.000	5 colônias	3 colônias	3 colônias	Não cresceu	Sem CO2
"	"	1/ 1.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 100.000	Incontável	Incontável	Incontável	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 1.000.000	68 colônias	65 colônias	60 colônias	Incontável	Com CO2
"	"	1/ 10.000.000	60 colônias	12 colônias	10 colônias	Incontável	Com CO2

Das 128 placas semeadas apresentaram crescimento 106, sendo: 28 em meio de Farr, 28 em meio M.R., 26 em meio de fígado e 24 em meio de Sabouraud. O número total de colônias obtidas foi o seguinte:

Meio de Farr	{	Com CO ₂ — 1.774 colônias
		Sem CO ₂ — 1.325 colônias
Meio M.R.	{	Com CO ₂ — 1.295 colônias
		Sem CO ₂ — 1.023 colônias
Meio de Fígado	{	Com CO ₂ — 1.305 colônias
		Sem CO ₂ — 1.092 colônias
Meio de Sabouraud	{	Com CO ₂ — 1.176 colônias
		Sem CO ₂ — 1.063 colônias

Como se pode verificar pelo quadro apresentado, o número de colônias obtidas pelo crescimento em meio de Farr, em atmosfera com CO₂, é bem maior do que o obtido nos outros meios e sob condições idênticas, parecendo-nos ser um bom meio de cultura para o fim a que é aconselhado, isto é, semeadura e contagem em placa de germes do grupo *Lactobacillus*. Diante dos bons resultados obtidos, foi êsse o meio por nós empregado na verificação dos produtos acidófilos.

Conclusões: Das experiências feitas comparativamente com 4 meios diferentes de cultura, chegamos às seguintes conclusões: 1.^a) os germes pertencentes ao grupo dos *Lactobacillus* têm melhor crescimento quando incubados em atmosfera contendo dióxido de carbono. 2.^a) O meio de Farr, aconselhado pela "Food and Drug Administration-Federal Security Agency", favorece melhor o crescimento desses germes, além de apresentarem as colônias maior desenvolvimento.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — RETTGER, L. F. e col. — 1935 — "Lactobacillus acidophilus & its Therapeutic application".
- 2 — KOPELOFF, Nicholas — 1926 — "Lactobacillus acidophilus". Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1926.

- 3 — RETTGER, L. F. e col. — 1935 — “Lactobacillus acidophilus & its Therapeutic application.
- 4 — KULP, Walter L. — 1926 “The determination of viable Lactobacillus acidophilus”. *Science* 6: 304.
- 5 — KULP, Walter L. — 1927 — “Scientific Apparatus and Laboratory Methods. An agar medium for plating L. acidophilus e L. bulgaricus”. *Science* 66: 512.
- 6 — KULP, Walter L. and WHITE, Vinton — 1932 — “A modified medium for plating L. acidophilus”. *Science* 76: 17.
- 7 — BACHMANN, F. M. e FROST, W. D. — 1932 — “Vegetable Peptone Agar for quantitative Work with Lactobacillus acidophilus”. *Jour. Bact.* 23: 39.
- 8 — SABINE, David B. — 1935-36 — “A comparison of media for plating L. acidophilus”. *Jour. Lab. Clin. Med.* 21: 848.
- 9 — VALLEY, George and RETTGER, L. F. — 1926 — “Carbon Dioxide Requirements of Bacteria”. *Jour Bact.* 11: 78.