

ENSAIO SÔBRE MANUTENÇÃO DE LACTOBACILOS EM MEIO 3 DE ROGOSA, MITCHELL E WISEMAN. (NOTA PRÉVIA).

Luiz Carlos Tovo *

Nos fins do século passado foram intensas as pesquisas tentando encontrar um agente microbiano causador da cárie dentária.

Dentre estas pesquisas, deve-se salientar as de Willoughby D. Miller, (1) que, como conclusões de seus estudos, destacou um grupo de microrganismos freqüentemente encontrados em processos cariosos.

Dêstes microrganismos, alguns bacilos gram-positivos, foram posteriormente identificados como sendo o que atualmente se conhece como Lactobacilos.

E' importante o estudo de Lactobacilos em Odontologia, porque são apontados como um dos possíveis agentes capazes de formar ácidos, por fermentações de hidratos

de carbono, iniciando o processo cárie.

O estudo de Lactobacilos, entretanto, é algo complexo, devido às dificuldades que se apresentam quer para o isolamento como na manutenção de amostras, a qual é feita, rotineiramente, pelo repique diário em meio de leite.

Dentre os processos para isolamento em aerobiose dêstes microrganismos orais, destaca-se aquêlê idealizado por Rogosa, Mitchell e Wisemann (2).

Nas pesquisas dêstes autores, e mais Disraely (3), sôbre diferenciação de Lactobacilos da bôca, encontramos um meio, por êles denominado meio 3.

* Colaborador de Ensino da Cátedra de Microbiologia.

Nêsse meio, e em variações do mesmo, conseguiram observar as fermentações de açúcares produzidas pelas amostras isoladas.

Devido às dificuldades citadas e tomando conhecimento dêsse meio 3, imaginamos testar o tempo de vida que mantinham *Lactobacilos* nêsse meio, na estufa à 37°C.

O meio 3 foi preparado e distribuído em tubos de hemólise, 3ml. cada um e esterilizado em autoclave durante 20 minutos, a uma temperatura de 120°C.

A técnica empregada foi a seguinte: recolhemos saliva após o café da manhã, cerca de 5 ml. em um frasco esterilizado, e homogenizamos a mesma sacudindo-a na mão durante dois minutos.

Diluímos depois, 1ml. da saliva em 4ml de caldo dextrose, pH 5.0, e semeamos 0,1ml. dessa diluição em uma placa de meio ágar tomate pH 5.0 e em uma placa de meio S.L.

Levadas as placas à estufa 37°C, depois do 3.º dia recolhemos uma colônia do meio S. L., e depois do 4º dia recolhemos duas colônias do meio ágar tomate.

As três colônias pescadas foram as seguintes:

- 1 — Do meio de ágar-tomate — branca, convexa, brilhante,

circular, bordos nítidos, crescendo em superfície e de 2 mm. mais ou menos de diâmetro.

- 2 — Do meio de ágar tomate — semi-transparente, de bordos irregulares, espaiada, crescendo em superfície.

- 3 — Do meio S. L. — branca, em forma de disco, brilhante, crescendo em profundidade.

Essas três colônias foram levadas diretamente para um tubo de meio 3, cada uma.

Depois de 24 h. fizemos um esfregaço de cada um dos tubos e coramos pelo Gram, mostrando-nos a presença de bacilos Gram positivos, não esporulados que conforme Jay (4) consideramos *lactobacilos*; repicamos uma alça de platina para novo tubo de meio 3.

Depois de 48 h. fizemos outros esfregaços dos três tubos semeados no dia anterior, para confirmarmos a pureza do cultivo. Novo repique a partir dos primeiros tubos (24h.).

Assim fizemos, diariamente, pelo período de 22 dias, quando então não nos foi mais possível repicar, uma vez que não havia mais meio 3 nos primeiros tubos (24h.) devido à evaporação sofrida pelos mesmos dentro da estufa à 37° C.

Fórmulas:

Meio 3.

Trypticase (BBL)	10 g
Yeast Extract (Difco)	5 g
KH ₂ PO ₄	6 g
Citrato de amônio (NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇	2 g

(+) Solução de sais	5 ml
Sorbitan Monooleate (Tween 80)	1 g
Acetato de Sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	15 g
Vermelho de alizarine S.	0,04 g
H_2O destilada	100 ml. q.s.p.

pH 5.4

(+) Solução de sais:

Mg $\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	11,5 g
Mn $\text{SO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,4 g
ou Mn $\text{SO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,86 g
Fe $\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,68 g
H_2O destilada	100 ml. q.s.p.

Caldo Dextrose

Caldo de carne	1000 ml.
Bacto Peptona	10 g
Na Cl	5 g
Dextrose	10 g

pH 5.0 com ácido clorídrico

Agar Tomate

Suco de tomate	2000 ml
Leite peptonizado	50 g
Bacto Peptona	50 g
Ácido láctico normal	20 ml
Na OH até pH 5.0	
H_2O destilada	3000 ml
Agar	2-3 %

Meio S.L.

O mesmo meio 3, mais:

Glicose	20 g
e aumentando a quantidade de	
Acetato de sódio	20 g
Agar	15 g

Nossas observações foram as seguintes:

Em repiques de 24 horas os cul-

tivos das colônias estudadas nem sempre apresentaram um crescimento visível a olho nu, sendo ne-

cessário, às vezes, comprovação microscópica do crescimento.

O aspecto do crescimento, quando visível a olho nu, foi o de simples turvação ou algumas vezes floculação.

Resumo — Estudamos a capacidade de manter vivos *Lactobacilos* no meio 3, colônias destes microrganismos isolados em meios de Agar-Tomate e S. L.

Observações feitas durante 22 dias, mostram ser bastante promissor o emprêgo deste meio para manutenção de *Lactobacilos* vivos, durante o período de 20 dias, na estufa à 37° C.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Miller, W. D.
The Micro-Organisms of the Human Mouth. S. S. White
- Dental Mig. Company, Philadelphia, 1890.
- 2) Rogosa, M., Mitchell, J. A., Wiseman, R. F.
A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. — J. D. Res. — 30:682-689, 1951.
- 3) Rogosa, M., Wiseman, R. F., Mitchell, J. A., Disraely, M. N., assistido por Beaman, A.J.
Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov spec and *Lactobacillus cellobiosus* nov spec. — J. Bact. 65:681-699, 1953.
- 4) Jay, P.
Comunicação pessoal, descrevendo a técnica de contagem de lactobacilos empregado em seu laboratório.