

TIPOS DE COLÔNIA E CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE CULTURAS DE *Clostridium chauvoei* ISOLADAS DE BOVINOS NO BRASIL

FERNANDO GOMES F. LIMA

ABSTRACT.- Lima F.G.F. 1992. [Colony types and biochemical characteristics of *Clostridium chauvoei* isolated from cattle in Brazil.] Tipos de colônia e características bioquímicas de culturas de *Clostridium chauvoei* isoladas de bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 12(3/4):65-69. Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970, Brazil.

The morphological variation of colonies and biochemical characteristics of *Clostridium chauvoei*, isolated from the metatarsal and metacarpal bones of bovines with a history of blackleg, were investigated. The 59 cultures isolated contained 7 distinct morphological types of *C. chauvoei* and only 10 (16.95%) showed Type IV growth according to Zeissler (1928). All cultures hydrolized gelatin, had no proteolytic activity and produced neither lecithinase nor lipase. Only 51 (86.44%) of the 59 cultures showed saccharolytic activity (lactose fermented). The biochemical profile was increased to 29 biochemical tests. The results indicate the morphological heterogeneity and biochemical variations of *C. chauvoei* in our environment.

INDEX TERMS: Blackleg, *Clostridium chauvoei*, colonial variation, biochemical characteristics.

SINOPSE.- A variação morfológica de colônias e do comportamento bioquímico de culturas de *Clostridium chauvoei*, isoladas de ossos metatarsianos e metacarpianos de bovinos com histórico clínico de carbúnculo sintomático, foi analisada. Das 59 culturas estudadas, observaram-se 7 tipos morfológicos distintos de *C. chauvoei* e somente 10 (16,95%) apresentaram crescimento do tipo IV. Todas as culturas isoladas hidrolizaram a gelatina, não apresentaram atividade proteolítica e nem produziram lecitinase e lipase. Das 59 culturas testadas 51 (86,44%) fermentaram a lactose (atividade sacarolítica). O perfil bioquímico foi ampliado para 29 provas bioquímicas. Estes resultados demonstraram a heterogenicidade morfológica das colônias de *C. chauvoei* no nosso meio, apresentando variações nos seus parâmetros bioquímicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Carbúnculo sintomático, *Clostridium chauvoei*, variação morfológica de colônias, comportamento bioquímico.

INTRODUÇÃO

Clostridium chauvoei é bactéria anaeróbia, hemolítica, Gram-positiva, formadora de esporos, causadora do carbúnculo sintomático ou da "manqueira".

Zeissler (1928) descreveu as colônias formadas por *C. chauvoei*, em placas de agar sangue glicosado, como formas circulares, forma regular de botão de madrepérola, representando o tipo IV de crescimento de Zeissler e dada como característica da espécie. Também foram observadas colônias irregulares, com bordos denticulados e superfície rugosa. Fortner (1929) declarou que, além dos

aspectos descritos por Zeissler (1928), poderiam-se encontrar colônias de *C. chauvoei* de forma irregular, espalhadas, em forma de véu fino. Wolters & Dehmal (1928) observaram, também, irregularidades nas colônias de *C. chauvoei*, sendo observadas constantemente colônias de elevação umbilicada e superfície rugosa. Viljoen & Scheuber (1926), procuraram explicar a variabilidade nas colônias de *C. chauvoei* pelo tempo de estocagem dos meios de cultivo utilizados e idade das culturas testadas para a semeadura em placas, enquanto McEwen (1926) e Rottgardt (1932) abstiveram-se de quaisquer explicações. Cato et al. (1986) observaram um certo pleomorfismo, principalmente em culturas antigas, com aparecimento de colônias em forma de limão. No Brasil, Rodrigues (1936) sugeriu que a variação entre as colônias de *C. chauvoei* poderia ser devido principalmente às tendências individuais de cada amostra estudada. Mais recentemente Saraiva (1984) descreveu as colônias formadas por *C. chauvoei*, em meios semi-líquidos, como formas naviculares, podendo apresentar-se como formas leveduriformes. Entretanto, Santos & Mós (1985) descreveram as colônias como geralmente circulares, com bordos inteiros, podendo apresentar bordos irregulares de coloração branco-acinzentada. Já, Bier (1985) descreveu as colônias de *C. chauvoei* como colônias pequenas, circulares, achatadas, podendo emitir expansões sob forma de filamentos entrelaçados ou mesmo coalescendo num véu contínuo, já observados por Fortner, em 1929.

Na identificação bioquímica de *C. chauvoei* existem inúmeras contradições na literatura mundial que dificultam a sua precisa classificação. Segundo Nicolet (1985),

¹ Aceito para publicação em 29 de janeiro de 1992.

² Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista do CNPq.

C. chauvoei não fermenta a lactose, o que contradiz todos os achados da literatura, o mesmo com relação a não fermentação da sacarose (Mette 1980).

O presente trabalho objetivou verificar a variação morfológica da colônia de *C. chauvoei* isolada em nosso meio, após a fixação da idade das culturas, tempo de estocagem e espessura da camada das placas de agar Columbia sangue, bem como o período e sistema de incubação anaeróbica, que eventualmente, poderiam influenciar na formação das colônias, para o diagnóstico seguro do carbúnculo sintomático e estabelecer seus parâmetros bioquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento

As 59 culturas de *Clostridium chauvoei* utilizadas no presente trabalho foram isoladas no Setor de Microbiologia, da Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal da Embrapa, Rio de Janeiro, de medula óssea de metacarpos e metatarsos de bovinos.

O material coletado da medula óssea foi suspenso em salina estéril e dividido em 2 alíquotas das quais uma foi aquecida diretamente por 10 minutos, em banho-maria a 80°C. Ambas foram semeadas em meio de caldo de fígado glicosado (Tarozzi 1905) e em placa de agar Columbia (Firma Merck), este acrescido de 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro. Os tubos com meios de Tarozzi foram aquecidos previamente em banho-maria durante 10 minutos e resfriados imediatamente, antes da inoculação e incubação a 37°C, por 48 horas em estufa bacteriológica. As placas de agar Columbia sangue foram incubadas em atmosfera anaeróbica (Jarra do Sistema GasPak, Firma Becton & Dickinson Cockeysville, Maryland, USA), junto com um envelope ativado de H₂ e CO₂ e catalizadores de paládio, próprios do Sistema GasPak, a 37°C por 48 horas. Da vegetação obtida nos tubos de caldo de Tarozzi foram feitas novas placas de agar Columbia sangue. Paralelamente, as colônias isoladas em anaerobiose, foram repicadas em 2 placas de agar Columbia sangue para incubação em atmosfera microaerófila e em aerobiose, para determinação da condição de anaeróbio obrigatório do microrganismo estudado.

Para observação do tamanho e da forma dos elementos bacterianos, bem como a reação tintorial e a eventual presença de esporos, foram realizadas colorações pelo método de Gram modificado (Kopeloff & Beerman 1922), tanto das culturas obtidas dos tubos de caldo de Tarozzi, como as placas de agar Columbia sangue.

Provas biológicas

Após a comprovação de pureza da cultura, foi semeada uma colônia da amostra testada em tubo de caldo de Tarozzi. Após 48 horas de incubação a 37°C em estufa bacteriológica, foi inoculado 1 ml do material obtido do caldo de Tarozzi, acrescido de 1 gota de ácido láctico³ em cobaio adulto (300g), por via intramuscular.

Após a morte do animal procedeu-se a necrópsia com observação do tipo de edema, formação de gás e a coleta de fragmento de fígado e baço para o possível reisolamento do microrganismo. Foram realizadas também impressões de fígado para observação microscópica do agente pela coloração do método de Gram modificado.

Provas bioquímicas

Para identificação das culturas isoladas pela fermentação de carboidratos foi utilizado um meio de tioglicolato sem dextrose e sem indicador⁴, na concentração de 5%, acrescido de 2% de extrato de levedura³, e os diferentes açúcares na concentração final de 1%. Foram utilizados os seguintes açúcares: ramosse⁴, trealose⁴, galactose³, glicose⁴, frutose⁴, rafinose⁴, celobiose³, arabinose³, lactose⁴, dulcitol⁴, maltose³, manose⁴, sacarose⁴, sorbitol⁴, xilose⁴ e inositol³. Foram utilizados, também, os álcool-açúcares glicerina³ e manitol³, na concentração de 1%. Para as provas de nitrato⁴, triptofano⁴, esculina³ e uréia⁴ foram utilizadas as concentrações 0,2%, 0,002%, 1% e 1%, respectivamente.

O meio de tioglicolato foi distribuído em tubos de 15 x 125mm, sem tubos de Durham, em porções de 8ml, e esterilizados sob pressão a 120°C por 30 minutos. A substância a ser testada foi adicionada assepticamente ao meio de tioglicolato, de forma que a concentração final fosse de 1%. Os carboidratos foram esterilizados sob forma de solução aquosa a 10%, por aquecimento em vapor flutuante, por 30 minutos, 3 dias sucessivos. Após a semeadura profunda de 1 ou mais colônias da cultura crescida, em anaerobiose, da placa de agar Columbia sangue, em tubos de caldo de meio de tioglicolato, contendo os diferentes carboidratos nas diferentes concentrações, acrescentou-se uma camada de parafina estéril, para evitar a entrada de ar. Os tubos de meio de tioglicolato inoculados foram então incubados por 8 dias, a 37°C, em estufa bacteriológica. Após a incubação foram acrescentadas 3 gotas de uma solução aquosa de 0,2% de azul de bromotimol aos diferentes tubos de tioglicolato contendo os diferentes açúcares, álcool-açúcares, esculina e uréia. A solução aquosa de 0,2% de azul de bromotimol foi obtida de 2g de azul de bromotimol³, 50ml de solução de 1/10 NaOH e 950ml de água destilada.

Ao acréscimo da solução de azul de bromotimol aos tubos de tioglicolato não semeados e nem incubados, obtém-se uma coloração verde, indicando assim a reação negativa. A reação positiva foi indicada sempre pela mudança de coloração do meio de tioglicolato de verde para amarelo-avermelhado, após o acréscimo do indicador azul de bromotimol. As provas de fermentação de carboidratos foram baseadas nos trabalhos de Mette (1980), sendo modificados conforme descrição acima.

A verificação de lecitinase e lipase foi efetuado em meio de gema de ovo (McClung & Toabe 1947), modificado segundo técnica descrita no Anaerobic Bacteriology CDC Laboratory Manual (Dowell & Hawkins 1974). As placas foram examinadas após 5 dias de incubação em atmosfera anaeróbica, evidenciando-se a degradação de gema de ovo. *C. perfringens* (CCM 5744-Type A) e *C. sporogenes* (NTC 532) serviram de controles positivos para a prova de lecitinase e lipase, respectivamente. A atividade proteolítica sobre a caseína e a sacarolítica sobre a lactose foi verificada em meio de agar leite (Davis 1959, Klose 1968a,b). Foi utilizado também, o meio líquido de leite tornasol para a verificação da atividade sacarolítica das culturas estudadas. A produção de H₂S, teste de urease e hidrólise da gelatina foram realizadas segundo técnicas descritas no Anaerobe Laboratory Manual (Holdeman et al. 1977).

Variação morfológica das colônias

Para o estudo de variação morfológica foram selecionadas 59 culturas de *C. chauvoei*. Foram fixados os seguintes fatores: ida-

³ Fa. Merck, Darmstadt, RFA.

⁴ Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

de da cultura em 7 dias, quantidade de inóculo semeado equivalente ao conteúdo de 1 alça de platina, tempo de estocagem de 48 horas e espessura de 0,3 cm de camada das placas de agar Columbia sangue, bem como a duração de incubação de 48 horas das mesmas placas, em jarras de anaerobiose do sistema de GasPak.

As placas de agar Columbia sangue foram preparadas e guardadas por 24 horas em jarras de GasPak, junto com um envelope ativado de H_2 e CO_2 e catalizadores de paládio, mantidas a temperatura ambiente. Após as provas biológicas e bioquímicas, as 59 culturas foram semeadas em tubo de caldo de Tarozi e incubadas a 37°C, por 48 horas, em estufa bacteriológica, sendo que os tubos de caldo de Tarozi foram aquecidos previamente, em banho-maria, durante 10 minutos e esfriados, imediatamente antes do uso. Após vegetação e verificação de pureza de cada cultura crescida no meio de caldo de Tarozi, foram semeadas placas de agar Columbia sangue e incubadas em atmosfera anaeróbia a 37°C, por 48 horas. Após o crescimento, foi inoculada uma colônia de cada cultura de *C. chauvoei* estudada em novas placas uniformes de agar Columbia sangue que foram selecionadas previamente e incubadas a 37°C, por 48 horas, em jarras de GasPak. Após o crescimento levou-se as placas ao microscópico estereoscópico para análise da morfologia colonial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela observação do Quadro 1, verifica-se a grande variação morfológica das colônias de *C. chauvoei*, após a fixação de idade das culturas testadas e uniformização das placas de agar Columbia sangue, e incubação das mesmas, por 48 horas, em jarras de anaerobiose, sistema de GasPak. Já em 1926, Viljoen & Scheuber, procuraram atribuir a variabilidade nas colônias de *C. chauvoei* às diferenças de umidade do meio e idade das culturas testadas para a semeadura em placa. Das 59 culturas testadas de *C. chauvoei*, somente 10 (16,95%) apresentaram crescimento regular, em forma circular de botão de madrepérola, forma de crescimento IV de Zeissler (1928), colônia esta situada no centro de uma escavação do meio, e dada como característica da espécie. O mesmo autor observou também colônias de *C. chauvoei* de crescimento irregular com bordos denticulados e superfície rugosa, o que confirma nossos achados em 7 (11,86%) das 59 culturas testadas. Além da observação desses 2 tipos morfológicos de crescimento em placa, evidenciaram-se mais 5 tipos morfológicos diversos de crescimento expansivo, entre

eles o tipo espreado, observados também por Fortner (1929) e Rodrigues (1936). Seis (10,17%) das 59 culturas de *C. chauvoei* apresentaram diferentes tipos morfológicos de crescimento numa mesma placa de agar Columbia sangue (Quadro 1). Esse achado foi semelhante ao de Bier (1985) que observou colônias de *C. chauvoei* em forma de limão ou pera, ou em formas "monstruosas".

Santos & Mós (1985), descreveram as colônias de *C. chauvoei* como geralmente circulares, com bordos irregulares, translúcidas, brilhantes e de coloração branco-

Quadro 1. Tipos de colônias de *Clostridium chauvoei* encontrados em placas de agar Columbia sangue, incubadas em anaerobiose, sistema de Jarra GasPak, por 48 horas a 37°C

Amostras		Morfologia colonial
Nº	%	
18	30,51	Colônias de forma irregular, com bordos ondulados, achatadas porém com elevação centro-saliente, superfície rugosa e foscas.
10	16,95	Colônias de forma circular, forma regular de botão de madrepérola, com bordos inteiros, forma de crescimento IV de Zeissler, umbilicadas, superfície lisa e brilhantes.
8	13,56	Colônias de forma irregular, com bordos franjados, espaiadas, umbilicadas, superfície rugosa e foscas.
7	11,86	Colônias de forma irregular, com bordos denticulados, com elevação convexa baixa, superfície rugosa e foscas.
6	10,17	Diferentes tipos morfológicos na mesma placa.
6	10,17	Colônias de forma irregular, com bordos lobados, achatadas em forma de losangos, superfície lisa e foscas.
2	3,39	Colônias de forma irregular, com bordos franjados, espaiadas em forma de véu fino, superfície rugosa e foscas.
2	3,39	Colônias de forma risóide, com bordos franjados, espaiadas, estrutura filamentosa, superfície rugosa e foscas.

Quadro 2. Principais características encontradas das 59 culturas de *Clostridium chauvoei* isoladas

Amostras		Coloração		Crescimento Columbia Agar			Hémolise Columbia Agar Sangue	Agar Gema de Ovo		Hidrólise da Gelatina	Digestão da Caseína	Leite tornasolado	Produção de indol	Redução de nitrato	Produção de H_2S	Teste da urease
Nº	%	Gram	Esporo	A ^a	M	An		Lecitinase	Lipase							
18	30,51	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
10	16,95	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
8	13,56	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
7	11,86	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
6	10,17	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
6	10,17	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
2	3,39	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
2	3,39	+	OS	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-

^a A = crescimento aeróbio, M = crescimento microaerófilo, An = crescimento anaeróbio, OS = esporo oval/subterminal.

Quadro 3. Resultado das provas de fermentação de carboidratos das 59 culturas de *Clostridium chauvoei* isoladas

Provas bioquímicas	Reação positiva		Reação negativa		Reação incompleta	
	N ^a	%	N	%	N	%
Arabinose			59	(100,00)		
Celobiose			59	(100,00)		
Dulcitol			59	(100,00)		
Esculina			59	(100,00)		
Frutose	45	(76,27)	10	(16,95)	4	(6,78)
Galactose	46	(77,97)	13	(22,03)		
Glicose	57	(96,61)			2	(3,39)
Glicerina	3	(5,09)	55	(93,22)	1	(1,69)
Inositol			59	(100,00)		
Lactose	51	(86,44)	8	(13,56)		
Maltose	52	(88,14)	6	(10,17)	1	(1,69)
Manitol			59	(100,00)		
Manose	49	(83,05)	10	(16,95)		
Rafinose			59	(100,00)		
Ramose			59	(100,00)		
Salicina			58	(98,31)	1	(1,69)
Sorbitol	2	(3,39)	55	(93,22)	2	(3,39)
Sacarose	53	(89,83)	2	(3,39)	4	(6,78)
Trealose	1	(1,69)	58	(98,31)		
Xilose			59	(100,00)		

^a N = número de culturas.

acinzentada. Bier (1985) descreveu as colônias de *C. chauvoei*, crescidas em placas de agar sangue acrescidas de glicose, como geralmente colônias pequenas, circulares, chatas, o que seria a característica da espécie (forma de crescimento IV de Zeissler, 1928), podendo emitir expansões sob forma de filamentos entrelaçados ou mesmo

coalescendo num véu contínuo, vindo a confirmar nossos achados em 8 (13,56%) das 59 culturas estudadas, o que confunde as colônias de *C. chauvoei* com outras espécies de bactérias do mesmo gênero (Quadro 1). Um frequente pleomorfismo, em especial em meios semi-líquidos, com aparecimento de formas naviculares, outras intumescidas e às vezes, formas leveduriformes, foi observado por Saraiva (1984). Cato et al. (1986) observaram também esse pleomorfismo, principalmente em culturas antigas, com aparecimento de formas em limão, não observados neste trabalho. Entretanto, em 6 (10,17%) das 59 culturas testadas foram encontradas colônias em forma de losangos (Quadro 1).

Observaram-se também, após a semeadura direta do material coletado de medula óssea de bovino em placa de agar Columbia sangue e posterior incubação por 48 horas em atmosfera anaeróbia, pequenas colônias regulares do tipo circular, elevadas, brilhantes, cercadas por um halo de hemólise, extremamente parecidas com micro organismos hemolíticos do gênero *Streptococcus*.

Os resultados obtidos no Quadro 2 não diferiram muito daqueles obtidos por outros autores (Dowell Jr. & Hawkins 1974, Smith & Hobbs 1974, Holdeman et al. 1977, Werner 1985). Entretanto, no presente trabalho, verificaram-se variações nas provas de fermentação de carboidratos (Quadro 3).

Em propriedades gerais dos clostrídios, Saraiva (1984) citou que a fermentação de sacarose por *C. chauvoei* serviria para diferenciá-lo de *C. septicum* que não a fermentaria, e a fermentação de salicina serviria igualmente

Quadro 4. Comparação da fermentação de carboidratos por *Clostridium chauvoei* de diferentes autores

Carboidratos	Autores										
	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 ^c
Arabinose		-	-	-			-				-
Celobiose			d	-			+				-
Dulcitol			d								-
Esculina		-	-	-			+		-	-	-
Frutose			+	-			+				
Galactose			+				+				
Glicose	+ ^b	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Glicerina		-	-			-	-				-
Inositol			-	-							-
Lactose	+	+	+	(+)	+	+	+	+	-	(+)	
Maltose		+	+	+	+	+	+	+		+	
Manitol		-	-	-	-	-	-	-		-	-
Manose				(+)	+		d			(+)	
Rafinose				-			-			-	-
Ramose				-			-			-	-
Salicina		-	-	-	-	-	+	-		-	-
Sorbitol				-							-
Sacarose	+	+	+	(+)	+	+	-	+		(+)	
Trealose				-			-			-	-
Xilose		-	-	-			-			-	-

^a 1 Cowan (1974), 2 Dowell Jr & Hawkins (1974), 3 Smith & Hobs (1974), 4 Holdeman et al. (1977), 5 Smith (1977), 6 Blobel & Schliesser (1980), 7 Mette (1980), 8 Smith & Dowell Jr (1980), 9 Nicolet (1985), 10 Werner (1985), 11 Lima (1992).

^b + Reação positiva, - negativa, (+) positiva fraca, d = diferente.

^c Reação (90-100% das culturas).

para diferenciá-lo de *C. septicum* que a fermentaria, o que contradiz os resultados obtidos por Mette (1980). No presente trabalho, a fermentação da sacarose foi verificada somente em 53 (89,83%) das 59 culturas testadas, já a fermentação da salicina em 58 (98,31%), conforme Quadro 3.

No Quadro 4, pode-se comparar os resultados da fermentação de carboidratos por *C. chauvoei* de diferentes autores, com as suas respectivas interpretações com os nossos achados.

Os resultados deste trabalho demonstraram que *C. chauvoei*, independentemente da idade das culturas e uniformização dos meios de cultivos sólidos, apresenta as mais diferentes formas de crescimento e que a fermentação de carboidratos não é um critério preciso de diferenciação com outras espécies de clostrídios existentes no nosso meio, sendo necessárias outras provas complementares.

Agradecimentos.—Deixamos aqui nossos agradecimentos ao Prof. Dr. Hans Blobel, Diretor do Institut für Bakteriologie und Immunologie, Justus Liebig-Universität Giessen, Alemanha, pelo fornecimento das amostras padrão de *C. chauvoei* (NCTC 8070), *C. septicum* (CCM 5743), *C. perfringens* (CCM 5744-Typ A) e *C. sporogenes* (NCTC 532).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blobel H. & Schliesser Th. 1980. Handbuch der Bakteriellen Infektionen bei Tieren. Bd. II. Gustav Fischer, Stuttgart, S. 756.
- Bier C. 1985. Microbiologia e Imunologia, 24ª edição. Comp. Melhoramentos, S. Paulo. 1234 p.
- Cato E.P., George W.L. & Finegold S.M. 1986. Genus *Clostridium*. In: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. & Holt J.G. (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II. Williams & Wilkins, Cambridge, p. 66-69.
- Cowan S.T. 1974. The anaerobic bacilli (*Clostridium*, *Eubacterium*). In: Cowan S.T. & Steel K.J. (ed.). Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd ed. Cambridge Univ. Press., Cambridge, p. 66-69.
- Davis J.G. 1959. Milk Testing, 2nd ed. Dairy Industries, London.
- Dowell Jr. V.R. & Hawkins T.M. 1974. Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology. CDC-Laboratory Manual. Center for Disease Control, Atlanta, Georgia. 96 p.
- Fortner J. 1929. I. Zur Technik der Anaeroben-Züchtung. II. Zur Differenzierung der Anaerobier. Zbl. Bakt. I. Orig. 110:233-255.
- Holdeman L.V., Cato E.P. & Moore W.E.C. 1977. Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- McClung L.S. & Toabe R. 1947. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium sporogenes* and certain species of the gangrene and botulism groups. J. Bact. 53(1):139-147.
- McEwen A.D. 1926. Quarter-evil and braxy: studies regarding immunity. J. Comp. Path. Therap. 39(4):253-283.
- Mette H. 1980. Das Vorkommen von Clostridien in Produkten von Tierkörperbeseitigungsanstalten mit einem Beitrag zur Eignung von Selektivnährböden zum Clostridiennachweis. Inaug. Diss. Vet. Med., Universität Hannover.
- Nicolet J. 1985. Kompendium der Veterinärmedizinischen Bakteriologie. Verlag Paul Parey, Berlin. 280 S.
- Klose J. 1968. Harmonisierung des Speiseisrechtes in der EWG. Süsswaren 14:778-780.
- Klose J. 1968. Harmonisierung des Speiseisrechtes in der EWG. Süssschriften für Speiseeis in den Mitgliedsstaaten der EWG. Neufassung Anfangs III zum Entwurf vom 19.12.1966. Süsswaren 14:780-782.
- Kopeloff N. & Beerman P. 1922. Modified Gram stains. J. Infect. Dis. 31:480-484.
- Rodrigues C. 1936. Estudos sobre *Clostridium chauvoei*. Variações na morfologia das colônias. Arch. Inst. Biológico, S. Paulo, 19(7):235-244.
- Rottgardt A. 1932. Carbunclo sintomático de los ovinos a *Bacilo chauvoei* tipo ovino y bovino. Boln Minist. Agric. Nat. Argentina 31:102-135.
- Santos M.A.A.D. & Mós E.N. 1985. Manual de Bactérias Anaeróbias. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP. 170 p.
- Saraiva D. 1984. *Clostridium chauvoei*. In: Guerreiro et al. (ed.). Bacteriologia Especial. Editora Sulina, Porto Alegre, RS. 492 p.
- Smith L.D.S. 1977. The Clostridia. In: Laskin A.J. & Lechevalier H.A. (ed.). Handbook of Microbiology, Vol. I - Bacteria, 2nd ed. CRC Press, p. 337-346.
- Smith L.D.S. & Dowell Jr. V.R. 1980. *Clostridium*. Chapter 37. In: Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J. & Truant J.P. (ed.) Manual of Clinical Microbiology. 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Smith L.D.S. & Hobbs G. 1974. Genus III - *Clostridium*. In: Buchanan R.E., Gibbons N.E. (ed.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams & Wilkins Comp., Baltimore, p. 551-572.
- Tarozzi G. 1905. Über ein leicht in aerober Weise ausführbares Kulturmittel von einigen bis jetzt für strenge Anaeroben gehaltenen Keimen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 38:619-624.
- Viljoen P.R. & Scheuber J.R. 1926. Black-quarter in South Africa with special reference to improved methods of protective inoculation. Dept. Agric. South Africa, 11th e 12th Reports of the Dir. Vet. Educ. Res.: 499-570.
- Werner H. 1985. Anaerobier-Infektionen: Pathogenese, Klinik, Therapie, Diagnostik. 2. Auflage. Georg Thieme, Stuttgart. 199 S.
- Wolters K.L. & Dehmel H. 1928. Zur Züchtung und Differenzierung der anaeroben Sporenbildner unter besonderer Berücksichtigung der Rauschbrand und Pararuschbrand-Bazillen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 108(5/6):264-275.
- Zeissler J. 1928. Anaerobenzüchtung. In: Kolle W., Krauss R. & Uhlenhuth P. (ed.). Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen. Bd. 10. 3. Aufl., Gustav Fischer, Jena, S.30-145.