

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* (HUGH & RYSCHENKOW, 1960) DE MATERIAL CLÍNICO HUMANO, NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO¹

ALTAIR A. ZEBRAL * e ERNESTO HOFER *

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

SUMÁRIO: Os autores estudaram as propriedades morfo-bioquímicas e a sensibilidade às substâncias antimicrobianas, de uma nova e rara espécie de *Pseudomonas*, a *Pseudomonas maltophilia* (Hugh & Ryschenkow, 1960), isolada de secreção vaginal. Como características marcantes, dentre mais de 65 testadas, as amostras estudadas mostraram ser: oxidase negativa e lisina descarboxilase positiva; produziram desoxiribonuclease e um pigmento escuro que se difunde no meio; atacaram oxidativamente a maltose tanto em meio complexo nitrogenado como em meio de Hugh & Leifson e hidrolisaram a esculina. As amostras foram sensíveis ao cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, colistin e gabromicina.

A *Pseudomonas maltophilia* foi inicialmente descrita por **Hugh & Ryschenkow** (10) em 1960, os quais posteriormente em 1961, publicaram um estudo detalhado de suas propriedades anatômicas, fisiológicas e sorológicas.

Esta rara espécie de *Pseudomonas*, tem sido isolada de diversos materiais clínicos humanos: **Hugh e Ryschenkow** (10, 11) de fezes humana, sangue, líquido do pericárdio, líquido ascítico, líquido pleural, líquido espinhal e "swabs" de oro-faringe; **Thinbault** (22), de sangue, líquido céfalo raquiano, urina, escarro, pus de otite, pus de sinusite; **von Graevenitz** (23), de líquidos de corpo humano, ovários e gânglios; **Pickett and Pederson** (19), de

diversos materiais clínicos; **Sutter** (21) de epididimites, e outras infecções do trato urinário; **Gilardi** (6, 7, 8) de abscesso peri-uretral, infecções do trato urinário e outros materiais clínicos.

Alguns pesquisadores, já assinalaram, também, o isolamento desse microrganismo a partir de: água de rio, leite cru, fezes de coelho, **Hugh & Ryschenkow**, (10, 11); solo de região petrolífera **Iizuka & Komagata** (12), água, leite, fezes de cachorro, petróleo, **von Gravenitz** (23).

Até o presente momento, são raros os trabalhos que relatam o isolamento e caracterização dessa nova espécie de *Pseudomonas*. O número de amostras isoladas e estudadas, de origem humana ou não, por nós compu-

¹ Recebido para publicação a 3 de abril de 1973.

* Departamento de Microbiologia e Imunologia, Laboratório de Bacteriologia, Caixa Postal 926, Rio de Janeiro, Guanabara.

tado nos principais trabalhos na literatura mundial, de 1960 a 1971, atinge a 275 amostras (Tabela I).

Em nosso meio, não temos conhecimento de publicações sobre o assunto, a não ser a comunicação de **Zebral & Hofer** (25), em 1972 ao IV Cong. Brasileiro de Microbiologia sobre o isolamento de *Pseudomonas maltophilia* de secreção vaginal. No presente trabalho, estudam-se as características morfológicas e bioquímicas de 2 amostras isoladas de secreção vaginal, além da sensibilidade às substâncias antimicrobianas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento — O isolamento foi obtido a partir de agar-sangue, agar-chocolate, meio *Trypticase soy agar* (BBL), e meio *Eosine Methylene Blue agar* (Difco). Os meios líquidos usados foram o caldo simples e caldo *Trypticase soy* (BBL). As 2 amostras foram mantidas em caldo simples e repicadas mensalmente. O controle da pureza das culturas foi feito pela bacterioscopia corada pelo Método de Gram, além da semeadura em placas de agar-simples.

Identificação das amostras — Foi baseada nos trabalhos de Hugh & Ryschenkow, (10, 11); Stanier, Palleroni and Doudoroff, (20); Pickett & Pederson, (19); Gilardi (7, 8).

Aspectos morfológicos — A morfologia celular foi observada através esfregaço corado pelo método de Gram, a partir de culturas em caldo simples, com 20-24 horas de incubação a 37°C e também pela microscopia de fase. O aspecto colonial foi observado após 24 horas a 37°C em agar-sangue e Meio de *EMB agar* (Difco).

Provas bioquímicas — As provas e os meios empregados incluíram: produção de ácidos em meio com água triptosada contendo 1% de glicose, galactose, ramnose, manose, celobiose, xilose, arabinose, lactose, sacarose, maltose, manitol, dulcitol, sorbitol, salicina, utilizando-se o azul de bromo timol como indicador de pH, prolongando-se a incubação até 4 dias para a leitura final. Os mesmos açúcares foram estudados

no seu comportamento usando-se o meio de Hugh & Leifson (9); ataque ao tartarato de sódio e potássio em meio sólido de acordo com Jordan (13), sendo também usada a fórmula líquida; comportamento no meio com 10% de lactose em agar inclinado com vermelho de fenol segundo Chilton & Fulton (3); observação da oxidação ou fermentação da glicose em meio de Hugh & Leifson (9), produção do indol em água peptonada, utilizando-se o reativo de Kovacs para a sua evidenciação; prova de VM-VP em meio de Clark-Lubs, empregando-se a técnica de Barrit para VP; utilização do citrato em meio de Koser; comportamento em meio de KCN segundo Moeller (17); redução de nitrato a nitrito em caldo nitrado, utilizando-se o reativo de Griess Ilosva; atividade gelatinásica em meio com 12% de gelatina; reação de oxidase, de acordo com a técnica de Kovacs (16); os testes de produção de gás sulfídrico, urease e a mobilidade foram observados em meio de Costa-Vernin (4); a confirmação desta última prova foi feita em meio semi-sólido segundo fórmula de Kauffmann (14) e em microscopia de fase; a capacidade hemolizante foi determinada em meio de *DST agar base* (Oxoid), acrescido de sangue de carneiro citratado na proporção de 5%; produção de catalase e agar inclinado, utilizando-se água oxigenada a 3%; produção de pigmento em caldo simples, agar-simples, agar amido e meio King A e King B (15); descarboxilação da lisina de acordo com Moller (18) e com Carlquist (2), utilizando-se, nos dois casos a técnica da extração da amina formada; atividade desoxiribonuclease molhando o crescimento nas placas de *DNase Test Agar* (Difco) com solução de ácido clorídrico normal, após 24 horas de incubação e observando uma zona clara em volta do crescimento e, hidrólise da esculina pela observação de um precipitado negro em volta do crescimento em *Trypticase soy agar* (BBL) suplementado com 0,1% de esculina e 0,05% de citrato férrico. O tempo de incubação, a técnica e os reagentes das provas obedeceram às recomendações do "Manual of Microbiological Methods" da Society of American Bacteriologists (1957). Todos os carboidratos foram esterilizados por filtração e juntados

asépticamente aos meios, de modo a se ter uma concentração final de 1% do açúcar. Para os repiques utilizou-se a alça de platina com diâmetro interno de 4 mm e agulha de platina quando havia indicação.

Sensibilidade aos antibióticos — A sensibilidade aos antibióticos foi estudada pela técnica dos discos. Foram empregados os discos Oxoide, código 2024F, tipo urinário e os polidiscos antibióticos segundo Victor Lorian, conseguindo-se deste modo testar a sensibilidade às drogas relacionadas nas tabelas V e VI. O meio empregado foi o *DST agar Base* (Oxoide) e, o inóculo a partir de cultura em caldo simples de 24 horas a 37°C e espalhamento com "Swab" estéril. Após a semeadura na superfície das placas, foi eliminado o excesso de umidade pela incubação a 37°C durante 30-60 minutos. Leitura com 24 horas, tendo-se como critério de sensibilidade, o tamanho do halo de inibição de acordo com os padrões utilizados para os polidiscos antibióticos.

RESULTADOS

Morfologia celular e colonial — As duas amostras crescidas em caldo

simples, após 24 horas de incubação a 37°C, eram sempre Gram-negativos. Houve forte turvação no caldo, onde após 3-5 dias, apareceu um pigmento escuro. A morfologia foi tipicamente bacilar, semelhante à do gênero *Pseudomonas*. As colônias em agar-sangue e *EMB* (Difco) foram em geral circulares, bordo inteiro, convexas, lisas, brilhantes, transparentes, de tonalidade branco-acinzentado em agar-sangue e violáceas em meio de Teague. Não foi observado a presença de esporos nas culturas de 24 horas e nem após envelhecimento 2-7 dias, em estufa a 37°C (Tabela II) nenhuma das 2 amostras demonstrou capacidade hemolítica para sangue citratado de carneiro. As propriedades bioquímicas são vistas nas tabelas III e IV e a sensibilidade às substâncias antimicrobianas nas tabelas V e VI.

TABELA I

AMOSTRAS DE *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* ISOLADAS E CARACTERIZADAS NOS PRINCIPAIS TRABALHOS NA LITERATURA MUNDIAL

Autores	Ano	Número de amostras
Hugh & Ryschenkow	1960	34
Thinbault	1961	24
Hugh & Ryschenkow	1961	26
Gardner & col.	1970	36
Pickett & Pederson	1970	14
Gilardi	1971a	81
Gilardi	1971b	58
S o m a		273

TABELA II
ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS DUAS AMOSTRAS DE
PSEUDOMONAS MALTOPHILIA

Propriedade tintorial	Predominantemente Gram negativo
Morfologia	
a) celular ⁽¹⁾	Forte turvação em caldo simples, onde após 3-4 dias aparece um pigmento escuro. Morfologia tipicamente bacilar semelhante a do genero <i>Pseudomonas</i> .
b) colonial ⁽²⁾	Colônias circulares, bordo inteiro, convexas, lisas, brilhantes, transparentes, branco-acinzentadas em agar-sangue e violáceas em meio de Teague.
Esporos	Ausentes

⁽¹⁾ Aspectos observados após 24 horas a 37°C em caldo simples.

⁽²⁾ Aspectos observados após 24 horas a 37°C em agar-sangue e meio *E.M.B.* Agar (Difco).

TABELA III

CARACTERÍSTICAS DAS DUAS AMOSTRAS DE *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA*

Meio teste ou substrato	Resultado
Meio Costa-Vernin (C.V.)	Reação de alcalinidade
Meio de Teague	+ (2) crescimento
Hemólise (sangue de carneiro)	— (2)
Catalase	+ (2)
Gelatinase	+ (2)
Indol	— (2)
VM	— (2)
VP	— (2)
Citrato Koser	— (2)
KCN	+ (2)
H ₂ S	— (2)
NO ₃ -NO ₂	— (2)
Urease	— (2)
Mobilidade	+ (2)
Oxidação fermentação (H.L.)	+ (1) F4 Oxidação
Lactose a 10%	— (2)
Pigmento escuro	+ (2)
Hidrólise da aesculina	+ (2)
Pigmento fluorescente	— (2)
DNase	+ (2)
Oxidase	— (2)
Lisina descarboxilase	+ (2)

Cresc. = crescimento
 H.L. = Hugh-Leifson
 + = positivo (teste)
 — = negativo (teste)
 F4 = fraco com 4 dias.

TABELA IV

OXIDAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM MEIO NITROGENADO COMPLEXO
E NO MEIO DE HUGH-LEIFSON

Carboidratos	Meio nitrogenado complexo		Meio base de Hugh-Leifson	
	A.	N.A.	A.	N.A.
Glicose	0/2*	2/2	1/2	1/2
Galactose	0/2	2/2	0/2	2/2
Manose	0/2	2/2	0/2	2/2
Xilose	0/2	2/2	0/2	2/2
Arabinose	0/2	2/2	0/2	2/2
Celobiose	0/2	2/2	0/2	2/2
Ramnose	0/2	2/2	0/2	2/2
Lactose	0/2	2/2	0/2	2/2
Sacarose	0/2	2/2	0/2	2/2
Maltose	2/2	0/2	2/2	0/2
Manitol	0/2	2/2	0/2	2/2
Dulcitol	0/2	2/2	0/2	2/2
Sorbitol	0/2	2/2	0/2	2/2
Salicina	0/2	2/2	0/2	2/2

A = Ácido

NA = Nenhuma mudança no indicador

* = O numerador das frações indica o comportamento das amostras e o denominador o número de amostras testadas.

TABELA V
SENSIBILIDADE DAS DUAS AMOSTRAS DE *PSEUDOMONAS*
MALTOPHILIA AOS ANTIBIÓTICOS

Discos oxóides n.º 2024E tipo urinário		Amostras	
Antibiótico	Concentração	60-1	60-1
Ampicilina	25 μ g	S	S
Cloranfenicol	50 μ g	S	S
Tetraciclina	50 μ g	R	S
Ácido nalidixico	30 μ g	S	S
Gentamicina	10 μ g	S	S
Bactrin	25 μ g	S	S
Nitrofurantoina	200 μ g	R	R
Sulfadiazina	300 μ g	R	R

S = Sensível (16 — 24 mm)
R = Resistente (10 — 15 mm)
(abaixo de 10 mm)

TABELA VI
POLIDISCOS VICTOR LORIAN

Antibiótico	Concentração	Amostras	
		60-1	61-1
Aureomicina	15 μ g	R	R
Cloranfenicol	20 μ g	S	S
Eritromicina	15 μ g	R	R
Gabromicina	40 μ g	S	S
Kanamicina	30 μ g	S	S
Neomicina	25 μ g	S	S
Novobiocina	25 μ g	R	R
Colistin	45 μ g	S	S
Penicilina	5 μ g	R	R
Rifomicina	10 μ g	R	R
Ravomicina	35 μ g	PS	R
Oxacilina	5 μ g	R	R
Estreptomicina	15 μ g	R	R
Terramicina	20 μ g	R	R
Lincomicina	10 μ g	PS	S
Wintomylon	20 μ g	PS	S
Furadantina	50 μ g	R	R
Keflin (¹)	—	R	R
Ilosone (²)	—	R	R

1 — 2 — Discos avulsos
PS = Pouco sensível

DISCUSSÃO

Pelas características fisiológicas e bioquímicas apresentadas, a *Pseudomonas maltophilia* é possível de ser confundida com outras bactérias, principalmente com as do gênero *Alcaligenes*, com a *Bordetella bronchiseptica* e com outras *Pseudomonas* que não produzem pigmentos e que dão reação de alcalinidade em caldo peptonado glicosado.

Apesar dos poucos trabalhos que relatam o isolamento e estudo das propriedades bioquímicas desta nova espécie de *Pseudomonas*, já existem controvérsias e resultados discordantes.

Como acontece com outros bacilos Gram negativos não exigentes e não fermentadores, os pesquisadores têm observado dualidade de resultados no estudo da produção de ácidos a partir de hidrocarbonados. O fato já foi por nós salientado, **Zebreal e Hofer**, (24) devido ao emprego de meios nitrogenados complexos e meios sintéticos sem fonte de carbono para suportar o crescimento de bactéria. No primeiro caso, a dualidade de resultados parece ser devido à produção de substâncias alcalinas oriundas dos elementos complexos nitrogenados do meio, neutralizando o pouco ácido formado e, no segundo, conforme explicam **Baumann, Doudoroff, Stanier** (1), os testes para a produção de ácido a partir da glicose, devem ser realizados em meios sintéticos que possuem uma outra fonte de carbono para suportar o crescimento da bactéria.

De acordo com estes fatos já confirmados, os estudos de verificação de produção de ácidos a partir de hidrocarbonados dos chamados bacilos Gram negativos, não exigentes e não

fermentadores devem ser realizados sempre nos meios de cultura com reduzida proporção de material nitrogenado complexo que garanta o crescimento do microrganismo (0,2% de peptona), meio de **Hugh-Leifson** (9) e outras bases daí derivadas, cujos resultados deverão ser comparados com o meio nitrogenado complexo ou meio sintético adequado.

Obedecendo a estas normas verificamos que as 2 amostras de *Pseudomonas maltophilia* dentro das nossas condições de teste, apresentaram o mesmo resultado negativo para a produção de ácido a partir de meio nitrogenado complexo e meio de **Hugh-Leifson** (9), com a galactose, manose, xilose, arabinose, celobiose, ramnose, lactose, sacarose, manitol, dulcitol, sorbitol, salicina. Foram positivas para a maltose nos dois meios e somente uma amostra foi positiva fraca com 4 dias para a glicose (Tabela IV). Alguns desses resultados estão de acordo com os obtidos na literatura e, em relação à maltose os resultados são totalmente concordantes. É uma característica marcante, que serviu de motivo para o nome da espécie. O ataque à maltose se dá em meio nitrogenado complexo como no meio de **Hugh-Leifson** (9) (Tabela IV). Em relação a glicose há resultados contraditórios. As nossas 2 amostras, uma ataca fracamente, visível no 4.º dia de incubação; já outros autores, **Gilardi** (7 e 8) **Pickett & Pederson** (19), com estudo de 153 amostras encontraram ataque constante à glicose. Isto pode decorrer do maior período de incubação utilizado pelos 2 pesquisadores, 3 semanas a 37°C. Os próprios autores **Hugh & Ryschenkow** (11)

quando descreveram esta nova espécie de *Pseudomonas*, utilizando o meio de **Hugh-Leifson** (9), com 0,5% de Casitone (Difco), encontraram em 26 amostras resultados negativos para glicose e outros açúcares, dentro do pequeno tempo de leitura que empregaram. No entanto, salientaram os autores que algumas amostras que permaneceram no Laboratório por 8-10 anos repicadas periodicamente em meio semi-sólido passaram a dar fraca reação ácida após prolongada incubação em meio glicosado.

Há outras provas nas quais os resultados são sistematicamente negativos por falta de atividade bioquímica do microrganismo (Tabela III), hemólise indol, VM, VP, citrato Koser, H₂S, redução de nitrato a nitrito, urease, lactose a 10%, oxidase, porém, em outras provas as reações são características e marcantes tais como: prova da gelatina positivo, oxidase negativo, quando executado com solução preparada na hora, pela técnica de **Kovacs** (16), ou empregando-se *Oxidase discs* (Difco), **Stanier, Palleroni and Doudoroff** (20) **Gardner e col.** (5), **Gilardi** (7,8). Hidrólise de esculina positiva; atividade sobre o ácido desoxiribonucleico positiva; Lisina descarboxilase positiva; exigência de metionina para crescimento em base mineral, **Gilardi** (8); mobilidade positiva; catalase positiva e produção de um pigmento escuro que se difunde no meio conforme se observa na tabela II e nos trabalhos de **Hugh & Ryschenkow** (10, 11), **Gilardi** (7,8).

Em relação à sensibilidade às drogas antimicrobianas poucas infor-

mações existem a respeito. Os trabalhos de **Gilardi** (7,8) indicam uma resistência a 10 UI de penicilina e sensibilidade a 300 U de polimixina. O único trabalho a fazer um estudo mais completo sobre o assunto, é o de **Gardner e col.** (5), que testando 27 amostras de *Pseudomonas maltophilia* encontraram uma grande sensibilidade ao colistin, como também verificaram a 18 amostras de outras espécies de *Pseudomonas*. Ao contrário destas últimas, as amostras de *Pseudomonas maltophilia* foram sensíveis ao cloranfenicol. Os nossos resultados, como se observa nas tabelas V e VI, demonstram também para as duas amostras estudadas, sensibilidade para o colistin, cloranfenicol, além da gabromicina, kanamicina, gentamicina, e ácido nalidixico.

SUMMARY

Isolating and characterization of *Pseudomonas maltophilia* (**Hugh & Ryschenkow**, 1960) from human clinical specimens, in Rio de Janeiro, Guanabara, Brazil.

The authors have studied the morpho-biochemical properties and the sensibility at antimicrobial drugs, of specie of *Pseudomonas*, the *Pseudomonas maltophilia*, (**Hugh & Ryschenkow**, 1960), isolated from vaginal secretion.

Since important characteristics among more of sixty-five tested, the strains studied show to be: oxidase negative and lysine descarboxylase positive; to present deoxyrinonuclease

activity and produced a diffusible brown pigment: acid was produced by oxidation of maltose as much in nitrogenous complex medium as in **Hugh & Leifson** medium and they hydrolyse the esculin. The strains was sensible, for the colistin chloranfenicol, gabromycin, gentamycin and nalidix acid.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Robert E. Weaver, in Charge, Special Bacteriology Lab., Clinical Bacteriology Unit, Bacteriology Section, do Departamento of Health, Education and Werfare, Public Health Service, National Communicable Disease Center, C.D.C., Atlanta, Georgia, por haver gentilmente confirmado a identificação de nossas 2 amostras de *Pseudomonas maltophilia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M. & STANIER, R. I., 1968 — A study of the *Moraxella* group. II — Oxidative negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.*, 95 (5): 1.520-1.541.
- 2 — CARLQUIST, P. R., 1956 — A Biochemical Test for separating paracol groups *J. Bact.* 71 (3) : 339-341.
- 3 — CHILTON, M. L. & FULTON, M., 1946 — A presumptive medium for differentiating paracol from *Salmonella* cultures. *J. Lab. Clin. Med.*, 31, 824-827.
- 4 — COSTA, G. A. & SOLÉ-VERNIN, C., 1955 — Sobre u'a modificação do meio de Monteverde. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 53 (1) : 105-114.
- 5 — GARDNER, F.; GRIFFIN, W. B. SWARTZ, M. N. & KUNZ, L. J., 1970 — Non-fermentative Gram-negative Bacilli of nosocomial interest. *Amer. J. of Med.*, 48:735-749.
- 6 — GILARDI, G. L., 1969 — *Pseudomonas maltophilia* infections in man. *Amer. J. Clin. Path.*, 51 : 58.
- 7 — GILARDI, G. L., 1971a — Characterization of *Pseudomonas* Species isolated from clinical specimens. *App. Microbiol.*, 21 (3) : 414-419.
- 8 — GILARDI, G. L., 1971b — Characterization of nonfermentative non-fastidious Gram-negative bacteria encountered in Medical Bacteriology. *J. Appl. Bacteriol.*, 34 (3):623-644.
- 9 — HUGH, R. & LEIFSON, E., 1953 — The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 86:24-26.
- 10 — HUGH, R. and RYSCHENKOW, E., 1960 — An alcaligenes-like *Pseudomonas* species. *Bacteriol. Proceedings.* pág. 78.
- 11 — HUGH, R. & RYSCHENKOW, E., 1961 — *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. *J. gen. Microbiol.*, 26 (1):123-132.
- 12 — IIZUKA, H. & KOMAGATA, K., 1964 — Microbiological studies ou petroleum and natural gas. *J. gen. Microbiol.*, 36:405.
- 13 — JORDAN, E. O. & HARMON, P. H., 1928 — A new differential medium for the paratyphoid group. *J. Infect. Dis.*, 42:238-241.
- 14 — KAUFFMANN, F., In the: *Enterobacteriaceae*, second revised edition. Ejnar Menskagaard Publisher, Copenhagen, 1954.
- 15 — KING, E. O.; WARD, M. K. & ROMY, D. F., 1954 — Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44:301.

- 16 — KOVACS, N., 1956 — Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction, *Nature*, 178:703.
- 17 — MOELLER, V., 1954 — Diagnostic use the Braun KCN test within the Enterobacteriaceae. *Acta path. et Microbiol. Scand.*, 34:115-126.
- 18 — MOELLER, V., 1955 — Simplified tests for some amino acid decarboxylases and the arginine dihydrolase system. *Acta path. Microbiol. Scand.* 36 (2):158-172.
- 19 — PICKETT, M. J. & PEDERSON, M. M., 1970 — Characterization of saccharolytic nonfermentative bacteria associated with man. *Canad. J. of Microbiol.*, 16 (5):351-362.
- 20 — STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., 1966 — The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.* 43 (2):159-271.
- 21 — SUTTER, V., 1968 — Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. *Appl. Microbiol.*, 16: 1532.
- 22 — THINBAULT, P., 1961 — A propos d'*Alcaligenes faecalis*. *Ann. Inst. Pasteur*, supp. n.º 6, pág. 59-73.
- 23 — VON GRAEVENITZ, A., 1965 — The isolation of *Pseudomonas maltophilia* from clinical research material (water, milk, dog feces, contaminated tissue culture, petroleum, human body fluids, ovaries, lymph nodes). *Med. Welt.* 3:177.
- 24 — ZEBRAL, ALTAIR, A. & HOFER, E., — 1971 — Caracterização de Bacterias dos gêneros *Mima* e *Herellea* (Tribo *Mimeae*, DeBord. 1942). 1-Propriedades morfo-bioquímicas e sensibilidade aos antibióticos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 69 (2):57-76.
- 25 — ZEBRAL, ALTAIR A. & HOFER, E., 1972 — Isolamento de *Pseudomonas maltophilia* (Hugh & Rischenkow, 1960), uma nova espécie de *Pseudomonas*, em material clínico humano. IV Cong. Brasileiro de Microbiologia, 23 a 27 de julho, Niterói, Est. do Rio de Janeiro.