

Ricerche su alcuni micròbi del terreno ad attività ossidative

V. Treccani - C. Colla

E' noto che nel terreno agrario sono presenti, oltre alle sostanze umiche propriamente dette, una serie di prodotti organici, come alcool, zuccheri acidi grassi, composti ciclici ed eterociclici, che, o come tali o attraverso i loro prodotti di trasformazione intermedia, si originano nel terreno, durante la decomposizione microbiologica degli organismi animali e vegetali. Per molte delle suddette sostanze (alcooli, zuccheri, acidi, ecc.) si conoscono con sufficiente chiarezza i processi biologici di decomposizione, cioè si conoscono gli agenti microbici che presiedono ai processi medesimi, attraverso reazioni fermentative e ossidative di cui pure si ha per lo meno l'idea del meccanismo chimico.

Di altre sostanze, invece, il processo di mineralizzazione ci è ben poco noto; si sa che esso è operato da microrganismi, ma poco o nulla si conosce della natura e delle attività biochimiche dei germi, che, in modo specifico o non, presiedono a tale mineralizzazione.

Già diversi autori hanno studiato la decomposizione biologica degli idrocarburi e dei loro derivati; così: Söhngen (1), Störmer (2), Wagner (3) isolarono e descrissero microrganismi capaci di moltiplicarsi in presenza di benzolo, petrolio, olio di paraffina, tuluolo, xilolo, gas illuminante, fenolo, ecc. Perrier (4), riferendosi alle sue osservazioni circa l'azione ossidante degli eumiceti e schizomiceti sui composti della serie ciclica, (acido benzoico, salicilico e fenico) suppone che come termini intermedi di tali composti, normalmente esistenti nei vegetali e negli animali superiori, da cui possono passare al terreno in proporzioni non trascurabili, si formino dei corpi probabilmente vicini ai polifenoli, i quali in ambiente neutro o leggermente alcalino e sotto l'azione dell'ossigeno atmosferico si trasformerebbero in una materia colorante nera. Muschel (5) dimostrò che il *B. mesentericus* Niger produce corpi neri a partire da anelli benzenici.

Winogradsky (6) mise in evidenza l'ossidazione dell'acido benzoico mediante l'*Azotobacter* con formazione di un corpo nero.

Guittonneau e Chevalier (7) provarono l'*Azotobacter* su fenolo ed acido salicilico e trovarono pure formazione di corpo nero. Pochon e Tchan (8) hanno messo in evidenza l'ossidazione dell'acido benzoico nel suolo e dosando la quantità di humus di un terreno agrario prima e dopo la crescita di *Azotobacter* in presenza di benzoato di Na, hanno notato un aumento di sostanza umica.

In complesso però come si è detto le conoscenze acquisite in questo campo sono piuttosto sommarie, sia dal punto di vista microbiologico che

da quello biochimico; e perciò in vista di una più ampia sperimentazione, si è voluto recare un contributo preliminare allo studio dei processi di decomposizione di alcuni composti della serie aromatica (benzolo, toluolo, xilolo evv.) che notoriamente agiscono come antisettici sulla maggior parte dei germi.

Con la presente nota si riferiscono i risultati di un primo nucleo di ricerche relative all'isolamento in cultura pura di germi capaci di agire su codeste speciali sostanze, al loro carattere morfologico e culturale, nonché al loro comportamento di fronte alle sostanze medesime fornite con esclusivo substrato organico.

PARTE SPERIMENTALE

CULTURE DI ARRICCHIMENTO IN PRESENZA DI TOLUOLO

Come materiale microbico di partenza vennero usati terra e letame; come liquido culturale la seguente soluzione salina: KH_2PO_4 gr. I, NH NO_3 gr. I, MgSO_4 gr. I, CaCO_3 gr. 0,5, H_2O cc. 1000. A provettoni contenenti cc. 20 della predetta soluzione salina si aggiunse qualche mgr, di terra o di letame; questi provettoni, unitamente ad una provetta aperta contenente del toluolo, vennero posti in un recipiente di vetro chiuso, in termostato a 37° ; in tali condizioni l'atmosfera dei recipienti si saturava di vapori di toluolo. Così dopo alcuni giorni si è potuto constatare una crescita microbica variamente abbondante a seconda del materiale di semina. Con successivi trapianti eseguiti nelle medesime condizioni sperimentali, si sono potute, tra l'altro fare le seguenti constatazioni:

La moltiplicazione dei germi avveniva prevalentemente alla superficie del liquido sotto forma di pellicola fragile la quale, pur rompendosi e precipitando al fondo del provettone, veniva a riformarsi successivamente.

La moltiplicazione dei germi nei successivi trapianti aveva inizio solo con semine abbondanti, oppure in seguito ad aggiunta di piccole quantità di sostanze facilmente utilizzabili come glucosio, acetato di sodio, autolisato di lievito.

Occorreva però dimostrare che le culture ottenute utilizzavano effettivamente il toluolo; una lieve crescita si aveva infatti anche nelle provette di controllo il che stava ad indicare che il liquido culturale conteneva, indipendentemente dalla presenza di toluolo, tracce di sostanze organiche utilizzabili dai germi.

A tal fine è dato che con una semina molto abbondante non era del tutto sicuro l'accertamento della eventuale crescita a spese del toluolo, si è pensato di procedere ad un progressivo ingrandimento della cultura in base al seguente principio:

Se ad un dato volume di cultura microbica si aggiunge a regolari intervalli di tempo, liquido nutritizio, in modo da raddoppiare ogni volta il volume, è possibile, data la moltiplicazione dei germi, mantenere almeno costante la densità microbica iniziale, nonostante il progressivo ingrandimento della cultura medesima. Naturalmente questo è possibile solo quando i microrganismi trovano nel liquido aggiunto tutte le sostanze minerali in-

dispensabili, ed almeno un composto di C assimilabile, in quantità sufficiente per alimentare l'accrescimento voluto. Se invece tale sostanza organica dovesse mancare, la massa microbica di partenza, restando sempre la stessa, si diluirà sempre più, fino a scomparire praticamente del tutto. Se infine nel liquido aggiunto si ha la presenza di una o anche di più sostanze organiche, ma in quantità insufficiente, la densità microbica di partenza risulterà ancora in progressiva diminuzione, senza però scomparire praticamente del tutto, ma tendendo a stabilizzarsi in proporzione della disponibilità più o meno lieve dell'alimento organico. Pertanto, effettuando siffatti ingrandimenti riesce praticamente agevole e sicuro riconoscere l'attitudine di dati germi ad utilizzare una determinata sostanza come fonte di C.

Si procedette quindi con le seguenti modalità: a due provette uguali vennero aggiunte per ognuna cc. I di una cultura microbica a pieno sviluppo (proveniente da uno dei trapianti soprammenzionati) e cc. I della soluzione salina; una provetta fu posta in ambiente di toluolo, l'altra fu tenuta come controllo. Dopo 8 giorni si aggiunsero ad entrambe le provette cc. 2 della soluzione salina, così da raddoppiarne il volume, mantenendo sempre i recipienti nelle condizioni di partenza, ad intervalli regolari di 8 giorni si portarono i volumi a cc. 8, 16, 32, 64 ecc., trasportando le culture in recipienti appropriati mano a mano che il volume del liquido lo richiedeva.

In queste condizioni si è potuto constatare che già quando gli ingrandimenti avevano raggiunto i 32 cc., la massa microbica di partenza nel controllo poteva ritenersi praticamente scomparsa, mentre la cultura in presenza di toluolo presentava sempre uno sviluppo pressochè costante. Con questa esperienza l'effettiva utilizzazione del toluolo non poteva più lasciare alcun dubbio.

Come già è stato detto, si era osservato che con semina non abbondante la moltiplicazione dei germi, in presenza di toluolo, era favorita dall'aggiunta iniziale di sostanze facilmente utilizzabili; questo faceva supporre che l'utilizzazione del toluolo avvenisse solo quando la massa microbica aveva raggiunto una certa densità rispetto al liquido culturale. Questa osservazione suggerì la seguente esperienza:

A tre serie di provettoni contenenti 20 cc. della solita soluzione salina si aggiunsero rispettivamente: acetato di sodio, glucosio ed autolisato di lievito (quest'ultimo calcolato al 90% di H₂O) nelle proporzioni di 1 : 1000, 1 : 5.000, 1 : 10.000, 1 : 50.000, 1 : 100.000; effettuata la semina si posero a 37° in atmosfera di toluolo. Per ciascun tipo di sostanza impiegata e per ciascuna diluizione si allestì il relativo controllo.

Le tabelle I, II, III, danno una visione generale de risultati ottenuti.

Le concentrazioni più significative sono quelle di 1 : 5.000 e 1 : 10.000 dove il distacco tra la crescita nel controllo e quella in presenza dell'idrocarburo è notevolissima; già al secondo giorno di incubazione la moltiplicazione del germe nel controllo era terminata e la massa microbica formata precipitava sul fondo del provettone, lasciando perfettamente limpido il liquido culturale sovrastante. Viceversa in presenza di toluolo l'accrescimento microbico poteva continuare a lungo, con continue rigenerazioni delle pellicole superficiali.

ISOLAMENTI

Partendo dalle culture di arricchimento, ottenute come si è detto in precedenza, si allestirono delle culture di isolamento, usando come substrato la sopraddetta soluzione salina agarizzata, in piastre con l'aggiunta dell'1% di acetato di Na. Dalle piastre primitive vennero eseguiti successivamente nuovi isolamenti per ogni singola colonia. Poichè l'aspetto delle colonie si presentava assai diverso a seconda che lo sviluppo avveniva alla superficie o nello spessore dell'agar, le piastre vennero eseguite per striscio, anzichè per diffusione, e lo striscio venne effettuato con materiale previamente di-luito in acqua sterile ed energicamente sbattuto al fine di separare, per quanto possibile, i germi fra di loro ed ottenere colonie provenienti da un'unica cellula.

Si ottennero così due tipi di colonie:

1) Colonie tondeggianti del diametro di circa 2 mm.; con bordi irregolari ma non frastagliati e nucleo centrale tondeggiante più denso; nei primi giorni di crescita color bianco opaco, in seguito la colonia assume colorazione rosa salmone.

2) Simile alla precedente, ma con ispessimento al centro più piccolo e alone esterno più largo; color giallo chiaro.

CARATTERI MORFOLOGICI E CULTURALI

Ceppo I. - Bastoncini dritti o leggermente incurvati, con estremità arrotondate, per lo più di 1,6-2 x 0,7 μ spesso uniti a due a due e disposti a palizzata.

Colorazioni migliori con violetto di genziata e bleu di Loeffler, però il protoplasma non si colora uniformemente. Gram-positivo, non acido-resistente non produce spore, non riduce i nitrati a nitriti, non produce indolo, non dà gas nè acido dagli idrati di carbonio.

Ceppo II. - Piccoli cocchi di 0,5-0,6 μ di diametro, raramente uniti a due a due. Gram-positivi, non acido-resistenti, riduce a nitriti i nitrati, dà minime tracce di indolo, non dà gas da idrati di carbonio, forma acido da glucosio, levulosio, galattosio, arabinosio, maltosio, saccarosio (abbassamento del pH a 4,5-4,9), in minor quantità da lattosio (sino a pH 5,5 circa), destrine (pH 5,4), glicerina (pH 5,4).

PRODUZIONE DI PIGMENTO E CARATTERI CULTURALI		
	CEPPO I	CEPPO II
Sol. salina.+ acetato Na	Rosa pallido	Giallo opaco
Agar comune	Rosa pallido lucente	Giallo lucente
Agar malto	Rosa corallo - Crescita stentata	-
Agar lievito	Rosa pallido	Giallo
Agar peptone	Rosso bruno .- Crescita stentata	Giallo
Gelatina	-	Non fluidifica
Patata alcalinizzata	Rosa carne	Giallo
Latte	Rosa corallo Velo sup. Non coagula non pepton.	Giallo Velo sup. Non coagula non pepton.
Latte al tornasole	Non acidifica	Acidifica
Brodo comune	Rosa membrana superfic.	Crescita filamentosa sul fondo

Il Ceppo I, secondo la classificazione di Bergey et al. è riferibile al genere *Corynebacterium*, ma non è stato possibile identificarlo con nessuna delle specie descritte. Ulteriori indagini potranno precisare meglio la posizione sistematica del ceppo medesimo.

Il Ceppo II è identificabile, sempre secondo la classificazione di Bergey, con il *Micrococcus varians* Migula (famiglia *Micrococcaceae*).

I due ceppi furono trapiantati sia separatamente che insieme nella solita soluzione salina e mantenuti in atmosfera di toluolo; contemporaneamente furono allestiti i rispettivi controlli. Si è potuto così constatare che, mentre il Ceppo I si sviluppa agevolmente in queste condizioni, il Ceppo II assolutamente non si moltiplica; nella cultura mista si ha lo sviluppo del solo Ceppo I.

E' da notarsi che per ottenere una buona moltiplicazione delle culture di arricchimento in atmosfera di toluolo erano necessarie una reazione neutra o leggermente alcalina del mezzo culturale ed una temperatura di 37°. Variando sperimentalmente uno di questi fattori in modo da permettere una stentata moltiplicazione dei microbi, si osservava inoltre una predominanza dei cocchi sulle forme batteriche, che a loro volta apparvero modificate nella loro morfologia (forme involutive); nelle condizioni ottime di sviluppo invece si aveva una netta prevalenza di cellule batteriche uniforni e di aspetto simile a quello del Ceppo I successivamente isolato.

Infine si è osservato che se si varia uno di detti fattori, ad esempio la temperatura, nella cultura del Ceppo I in atmosfera di toluolo, si hanno, come nella cultura mista, modificazioni morfologiche ed anche la comparsa delle forme cocciche.

Questo comportamento può spiegarsi in due modi:

- il ceppo I non è in realtà una cultura pura, nonostante tutti gli accorgimenti con cui si sono eseguiti gli isolamenti;

- oppure il ceppo I è stato effettivamente isolato allo stato di purezza, ma, in condizioni di cultura non del tutto favorevoli, soggiace ad un processo di dissociazione; in tal caso la forma coccica, rappresentata dal ceppo II, non sarebbe che una variante del ceppo I, incapace di utilizzare il toluolo. Questa seconda interpretazione lascia tuttavia perplessi, date le spiccate differenze morfologiche cui si aggiungono alcune differenze culturali e fisiologiche di non poco conto (produzione di pigmento diverso e riduzione dei nitrati).

Comunque stiano le cose, è importante notare che, in condizioni favorevoli, il ceppo I si sviluppa come fosse sicuramente in cultura pura; perciò l'azione del toluolo non è da attribuire all'intervento di due germi simbiotici.

COLTURE DI ARRICCHIMENTO IN ATMOSFERA DI XILOLO E DI BENZOLO

Con la stessa tecnica usata per le esperienze in presenza di toluolo, precedentemente descritte, si sono allestite le culture in xilolo; l'isolamento in cultura pura di queste, ha consentito di ottenere un germe avente i medesimi caratteri culturali e morfologici del ceppo I sopra descritto.

In presenza di benzolo invece non si è riusciti ad ottenere che un debole sviluppo per cui non è stato possibile proseguire nelle indagini.

CONCLUSIONI

Nelle precedenti ricerche si è osservato che la massa microbica sviluppantesi alla superficie del liquido culturale si mantiene pressochè costante anche dopo molto tempo, mentre sul fondo del recipiente vanno gradatamente depositandosi le masse microbiche che soggiacciono a processi di lisi. Le culture si mantengono così in vita sino ad esaurimento di qualche componente della soluzione salina, purchè siano mantenute costantemente in presenza dell'idrocarburo voluto.

Mediante l'allestimento di culture con tracce di sostanze organiche di facile utilizzazione, nonchè mediante il metodo degli ingrandimenti progressivi, si è dimostrato necessaria la presenza di una abbondante massa microbica, affinché a moltiplicazione dei germi abbia inizio in presenza degli idrocarburi.

La possibilità che la massa microbica via via raccogliendosi sul fondo dei recipienti culturali possa fungere, attraverso la sua progressiva lisi, da fonte di sostanze organiche nutritive e stimolanti, non può essere esclusa a priori però la deduzione della utilizzazione degli idrocarburi cementati come fonte di carbonio da parte di questi germi, non viene per altro infirmata da tale eventualità, poichè la stessa funzione alimentare da parte dei corpi microbici, poteva svolgersi nei controlli privi degli idrocarburi, nei quali invece, come è stato detto precedentemente, l'accrescimento microbico era esiguo.

Il comportamento culturale osservato, ci richiama alla mente le ben note osservazioni del Wildiers sullo sviluppo dei lieviti. Egli infatti aveva osservato che i saccaromiceti si sviluppano in soluzione di sali minerali più zucchero, solo se si semina abbondantemente oppure se si aggiunge un po' di lievito bollito. Questo comportamento del lievito è stato spiegato ammettendo che dalle cellule morte si liberi una sostanza, il cosiddetto Bios, che fungerebbe da attivatore della crescita; i principali costituenti di esso, secondo recenti indagini, sarebbero il Bios I, mesoinosite, il Bios II o biotina, non adsorbibile da carbone animale, il Bios III, frazione adsorbibile dal carbone animale, la cui attività risulterebbe legata a tracce di β -alanina e l-leucina presenti come impurità, infine inosite, aneurina ed acido pantotenico. Così è verosimile supporre che i nostri germi per crescere, in presenza di solo toluolo o xilolo, avrebbero bisogno di speciali fattori di accrescimento, che si libererebbero dalle cellule morte per autolisi. Numerosi fattori di accrescimento, analoghi a componenti del Bios, sono stati identificati per varie specie microbiche; in particolare, per quanto concerne i *Corynebacterium*, è stato accertato che essi abbisognano di acido pimelico (9).

RIASSUNTO

Si sono isolati in coltura pura degli schizomiceti capaci di utilizzare, come esclusiva fonte di carbonio, toluolo e xilolo.

Di codesti schizomiceti sono state studiate le caratteristiche morfologiche e culturali.

SUMMARY

Pure cultures of schizomycetes have been isolated, being able to utilize toluene and xylene as exclusive source of carbon.

Of these schizomycetes have been endeavoured the morphological and cultural characteristics.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Söhngen, *Centr. F. Bakt. Paras. Abteil II.* 1905-1906, v, xv.
- 2) Söhngen, *Botanisches Centralblatt.* 1907, v, 105.
- 3) Wagner, *Zeitschrift f. Garünspannphysiologie.* 1914, vol. IV.
- 4) Perrier, *Annales de la Science agronomique française et étrangère,* 1913.
- 5) Muschel, *Biochem. Zeitschr.,* 1922, 131, 570.
- 6) Winogradsky, *Ann. de l'Institut Pasteur.* 1932, 48, 39.
- 7) Guittonneau et Chevalier, *C. R. Acad. Sci.,* 1938, 206, 863.
- 8) Tochon et Y. T. Tchan, *Ann. de l'Institut Pasteur,* 1946, 2.
- 9) Arnaudi, *Elementi di microbiologia generale ed applicata alle fermentazioni.* Ambrosiana, 3^a ediz., 1947.

(Pervenuto in redazione il 15-5-47).

TABELLA I

	A (I)		A (I) + acetato Na alle concentrazioni:									
			1:1000		1:5000		1:10.000		1:50.000		1:100.000	
	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.
dopo 2 giorni	-	±	+++	+++	++	+++	+	++	±	±	-	±
dopo 4 giorni	-	±	+++	+++	++	+++	+	+++	±	+	-	+
dopo 7 giorni	-	±	+++	++++	++	++++	+	+++	±	+	-	+
dopo 10 giorni	-	±	+++	++++	++	++++	+	+++	±	+	-	+
dopo 14 giorni	-	±	+++	++++	++	++++	±	+++	-	++	-	++

TABELLA II

	A (I)		A (I) + acetato Na alle concentrazioni:									
			1:1000		1:5000		1:10.000		1:50.000		1:100.000	
	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.
dopo 2 giorni	-	±	+++	+++	++	+++	±	+	±	±	-	±
dopo 4 giorni	-	±	+++	++++	+	++++	±	++	±	±	-	±
dopo 7 giorni	-	±	+++	++++	+	++++	±	+++	±	+++	-	+
dopo 10 giorni	-	±	+++	++++	+	++++	±	+++	±	+++	-	+
dopo 14 giorni	-	±	+++	++++	+	++++	±	+++	±	+++	-	++

TABELLA III

	A (I)		A (I) + acetato Na alle concentrazioni:									
			1:1000		1:5000		1:10.000		1:50.000		1:100.000	
	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.
dopo 2 giorni	-	±	+++	+++	++	++	+	+	±	+	±	+
dopo 4 giorni	-	±	+++	++++	++	+++	+	++	±	+	±	++
dopo 7 giorni	-	±	+++	++++	+	++++	+	+++	±	++	±	++
dopo 10 giorni	-	±	+++	++++	+	++++	+	+++	±	++	-	++
dopo 14 giorni	-	±	+++	++++	+	++++	±	+++	±	++	-	++