

Sovra le attività dei Flavobacteri, nei confronti dell'acido benzoico e di alcuni fenoli

R. Treccani Benetti

A. Schiesser

Le proprietà fisiologiche ed in particolare il potere ossidante dei microrganismi appartenenti al genere *Flavobacterium* sugli steroli e la capacità di alcuni ceppi di utilizzare sostanze organiche diverse, quali i glucidi, i poli-alcoli, gli stessi idrocarburi e derivati, sono già state più volte segnalate (1). E' parso pertanto interessante studiare il comportamento di alcuni ceppi in terreni sintetici aggiunti di acido benzoico, acido salicilico, resorcina, pirocatechina e fluoroglucina, nel duplice intento di stabilire se i diversi ceppi avessero su tali sostanze un comportamento analogo e di chiarire il meccanismo di azione.

Si è potuto stabilire che esiste una specificità dei diversi microrganismi nei confronti delle diverse sostanze in esame. Alcuni di essi sono in grado di utilizzarle come fonte di carbonio, in assenza di sostanze di più facile attacco, mentre in presenza di alcune sostanze della serie grassa, quali l'acetato di sodio, il glucosio, ecc. in piccole quantità, alcuni possono formare una sostanza bruno-nera. Ulteriori ricerche condotte su uno dei ceppi (AR₁) hanno permesso di stabilire che le proprietà e le caratteristiche di tale sostanza bruna sono molto simili a quelle delle sostanze umiche del terreno.

PARTE SPERIMENTALE

Caratteristiche morfologiche e culturali dei ceppi isolati

- AR₁ bastoncino $1,25 \times 1,8 \mu$, immobile, gram dubbio, non acido resistente, non produce indolo, non riduce i nitrati, non forma H₂S. Forma tracce di catalasi. Acidifica molto debolmente: glucosio, maltosio, saccarosio senza formazione di gas, non utilizza: lattosio, xilosio e glicerina. Probabilmente identificabile con *Flav. Flavotennae* Ehringer and Mondin. isolato dall'aria.
- AR₃ bastoncino $0,9 \times 1,2 \mu$, immobile, grampositivo, non acidoresistente, non produce indolo, non riduce i nitrati, forma tracce di H₂S. Produce catalasi in piccola quantità. Produce acido, ma non gas da glucosio, maltosio, saccarosio; cresce, ma non dà acido in presenza di lattosio e xilosio, non utilizza la glicerina. Isolato dall'aria: *Flavobacterium maris* Harrison.

- AR6 bastoncino $0,8 \times 1,7 \mu$, gram dubbio, non acidoresistente, non produce indolo, non riduce i nitrati; non forma H_2S . Produce notevoli quantità di catalasi. Acidifica debolmente, ma non produce gas da glucosio, saccarosio, maltosio, non utilizza, lattosio, xilosio e glicerina: *Flav. aurantiacum* Bergey et al., isolato dall'aria.
- AC5 bastoncino $0,8 \times 1,2 \mu$, immobile, gram dubbio, non acidoresistente, non produce indolo, forma nitriti dai nitrati, non forma H_2S . Produce tracce di catalasi. Produce acido, ma non gas da glucosio, saccarosio, maltosio, xilosio, glicerina, non dà acido da lattosio. Isolato da acqua. Non identificato.
- T3 bastoncino $1,5 \times 1,3 \mu$, grampositivo, non acidoresistente, non produce indolo, riduce i nitrati a nitriti, non forma H_2S . Produce acido ma non gas da glucosio e saccarosio, non dà acido da maltosio e lattosio, non utilizza xilosio e glicerina. Isolato da terra coltivata. Non identificato.
- I caratteri culturali sono riportati nella Tab. I.

**C O N S O R Z I O
P R O D U T T O R I
L A T T E D I M I L A N O**

primo esempio di un organismo volontario sorto in Italia per incrementare la produzione lattiera e per attuare norme e direttive tecniche-igieniche nei rapporti del problema del "buon latte", da destinarsi ai rifornimenti dei maggiori centri urbani.

*Soltanto un macchinario moderno
consente una lavorazione razionale*

BRAP

- Impianti completi per tutte le lavorazioni del latte
- Elettropompe Triumphator
- Scrematrici Triumphator
- Tele ritorte Morgenthaler
- Tele industriali

BRAP - Corso Milano 12a - Tel. 4019 - MONZA

CENTRO SPERIMENTALE DEL LATTE



- Fermenti selezionati per tutti i formaggi tipici
- Culture acidificanti ed aromatizzanti per burro
- Tutte le analisi microbiologiche e chimiche del latte e dei latticini
- Muffe selezionate per gorgonzola
- Consulenze tecniche scientifiche per l'industria lattiero casearia

MILANO - PARCO RAVIZZA - VIA SALASCO, 4 - TEL. 51.208 - 50.715

TABELLA I

Ceppo	Agar comune	Brodo comune	Agar lievito	Brodo lievito	Latte al tornasole	Patata	Gelatina
AR 1	+ Giallo limone	+ - Deposito giallo	+ Giallo arancio	+ - Pigm. in superf.	Acido	+ - Giallo pallido	Non fluidifica
AR 3	+ + Giallo arancio	+ + Pigm. in superf.	+ Giallo arancio	+ + Pigm. in superf.	Alcalino	+ + Giallo arancio	Non fluidifica
AR 6	+ + Arancio rosato	+ Deposito arancio	-	-	Inalterato	-	Non fluidifica
AC 5	+ Giallo intenso	+ Deposito giallo fiocc.	+ + Giallo	+ Pigm. in superf.	Alcalino	+ + Giallo bruno	Non fluidifica
T 3	+ Giallo oro int.	+ Deposito giallo	+ + Giallo oro int.	-	Inalterato	+ Giallo oro int.	Non fluidifica

Comportamento dei ceppi in esame in terreno sintetico con acido salicilico, benzoico, resorcina, pirocatechina e fluoroglucina, come unica fonte di carbonio.

I 5 ceppi vennero seminati in un terreno sintetico (*) contenente l'acido benzoico o i vari fenoli nella concentrazione dell'1 %. Le culture eseguite con la tecnica degli ingrandimenti (2) vennero tenute in osservazione per 40 giorni. Come risulta dai dati riportati nella tabella II, il comportamento dei singoli ceppi nei confronti delle varie sostanze saggiate diversifica notevolmente.

TABELLA II

	AR1	AR3	AR6	AC5	T3
controllo	—	—	—	—	—
salic. Na	+++	+	+++	+±	+++
benzoato Na	++	+++	—	++	+++
resorcina	—	++	+	—	±
pirocatechina	±	++	+	—	+
fluoroglucina	—	—	±	—	±

In colture di 40 giorni di AR₁ con salicilato di Na, la reazione dell'acido salicilico con cloruro ferrico risulta negativa.

Nell'intento di chiarire il meccanismo di tale attacco, ulteriori ricerche vennero condotte sul ceppo ARI.

Comportamento del ceppo ARI in terreno sintetico, con aggiunta di acido benzoico e dei vari fenoli, in presenza di altre sostanze organiche.

I risultati della precedente esperienza dimostrano che in assenza di altre fonti di carbonio il ceppo ARI è in grado di utilizzare l'acido salicilico e benzoico e non la resorcina, la pirocatechina e la fluoroglucina. Allo scopo di stabilire se un attacco di tali sostanze potesse aver luogo in presenza di altre fonti di carbonio, nel terreno sintetico contenente le sostanze già precedentemente saggiate, vennero aggiunti rispettivamente: glucosio, succinato, tartrato, formiato, citrato, lattato, acetato, malato e fumarato di Na, nella concentrazione dell'1 %.

In queste condizioni il microrganismo in genere ha uno sviluppo ottimale, tranne che in presenza di resorcina. La presenza di acido malico, acido fumarico, citrato, lattato e acetato di sodio determina nelle culture con pirocatechina la formazione di una sostanza intensamente colorata in bruno,

(*) KH₂PO₄ gr. 1, NH₄NO₃ gr. 1, MgSO₄·7H₂O gr. 1.
H₂O → 1000 cc. — pH = 6,8 - 6,9.

tale sostanza si forma anche nelle culture con fluoroglucina e salicilato in presenza di acetato di sodio. Una colorazione giallastra più o meno intensa si nota anche nelle altre culture.

Tale colorazione è probabilmente legata ad un attacco ossidativo di alcune delle sostanze in esame che ha luogo solo in presenza di un'altra fonte di carbonio della serie grassa.

La formazione di tale sostanza non è legata al pH della cultura.

Estrazione e proprietà della sostanza nera

Due palloni contenenti 2 litri e $\frac{1}{2}$ di soluzione salina e salicilato di Na nella concentrazione dell'1 %, rispettivamente con e senza acetato di Na (1 %) vennero insemenzati con una cultura di AR1 e incubati a 30°C. per 3 mesi. Dopo tale periodo la reazione del salicilato con cloruro ferrico è positiva in assenza di acetato e negativa in presenza di acetato. Le culture vennero concentrate nel vuoto sino a 700 cc. circa ed estratte ripetutamente con etere in ambiente acido.

Nella cultura senza acetato si estrae circa 2/3 dell'acido salicilico presente in partenza.

Il residuo dell'estrazione della cultura con acetato, venne precipitato con CHI concentrato a caldo. Il precipitato ha le seguenti caratteristiche: insolubile in alcool a freddo, all'ebollizione si sciogliono tracce, insolubile in alcool metilico a freddo, all'ebollizione si sciogliono tracce, insolubile in acetone, in etere di petrolio, in etere, in cloroformio, benzina, sia a caldo che a freddo. Solubile leggermente a freddo nella piridina, più solubile a caldo, solubilissimo negli alcali diluiti a freddo, con colorazione bruno rossastra, bruno nera, a secondo della concentrazione solubile in HNO₃ conc. con colorazione rosso bruna: diluendo si ha un precipitato fioccoso bruno, solubile in acetone, poco in etere.

Da tali caratteristiche la sostanza pare identificabile con la sostanza unica del terreno.

Le medesime caratteristiche possiede la sostanza nera, ottenuta per precipitazione in ambiente acido dalle culture contenenti oltre a fluoroglucina o pirocatechina, acetato di sodio.

RIASSUNTO

Sono stati isolati alcuni microorganismi appartenenti al genere Flavobacterium di cui vengono riportate le caratteristiche morfologiche e culturali. Alcuni di essi possono utilizzare l'acido benzoico o determinati fenoli in assenza di altre fonti di carbonio.

In presenza di acetato o di altre sostanze della serie grassa, alcuni formano una sostanza bruno-nera le cui caratteristiche sono molto simili a quelle della sostanza unica del terreno.

SUMMARY

Some microorganisms belonging to the Flavobacterium genus have been isolated and their cultural and morfogical properties have been specified in our researches. Some of the above microorganisms are able to utilize benzoic acid or certain phenol compounds as exclusive source of carbon.

Adding to the cultures sodium acetate or other substances some of the bacteria will form a substance of black-brown colour having characteristics similar to the humic substance of soil.

BIBLIOGRAFIA

- (1) C. Arnaudi: « Boll. I.S.M. », Vol. XXIII, 1944 - « Experientia », Vol. (1/4 1946).
- (2) V. Treccani, C. Colla: « Ann. Micr. », Vol. III, p. 198, 1947.