

ANNALI DI MICROBIOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA ALLA
AGRICOLTURA ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI;
DI ENZIMOLOGIA E CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI NEI LORO RAP-
PORTI CON LA MICROBIOLOGIA E LA BATTERIOLOGIA INDUSTRIALE

A CURA DEI PROFESSORI

T. CASTELLI, PERUGIA- G. DE ROSSI, PERUGIA- V. PEGLION, BOLOGNA
B. PEYRONEL, TORINO - R. PEROTTI, PISA - I. POLITI, MILANO
P. RENCO, MILANO - S. RICCARDO, NAPOLI- M. SACCHETTI, BOLOGNA
O. VERONA, FIRENZE

DIRETTA DA
C. ARNAUDI, MILANO

Vol. IV - Fasc. IV
1950

Segretario di Redazione
V. TRECCANI

DIREZIONE E AMMINISTRAZIONE: VIA CELORIA, 2
MILANO

NORME DI COLLABORAZIONE

Si accettano memorie originali italiane e straniere, purchè scritte in caratteri latini e dattilografate. Esse devono essere perfettamente corrette anche nella punteggiatura.

Ogni articolo deve essere corredato da un breve riassunto (non più di dieci linee) in italiano. Lo stesso deve essere pure riportato in tedesco o inglese o francese. Se l'Autore non ne fa l'invio in una delle due lingue verrà provveduto d'ufficio alla traduzione e la spesa relativa verrà addebitata ai signori autori.

Agli Autori dei lavori originali vengono concesse non più di 16 pagine di stampa; il numero di pagine in più sarà a carico dell'Autore al puro costo di stampa. Le modificazioni tipografiche che non siano semplici correzioni di errori di composizione saranno addebitate agli Autori a prezzo di costo.

I clichés, le tabelle e le tavole fuori testo sono a carico degli Autori.

Per gli estratti dei lavori gli Autori dovranno accordarsi direttamente con la Tipografia.

Per la bibliografia si prega di attenersi alle seguenti norme:

a) La bibliografia, col relativo numero di riferimento, deve essere scritta alla fine del lavoro; b) I numeri di riferimento bibliografico nel testo devono essere scritti tra parentesi; c) Le citazioni devono essere fatte nel seguente ordine: 1° Nome dell'Autore; 2° Titolo del lavoro; 3° Titolo del giornale abbreviato; 4° Anno; 5° Volume (in numero arabo, sottolineato); 6° N. delle pagine.

Il numero di chiamata nel testo di eventuali note ai piè di pagina deve essere scritto in alto piccolo e con una parentesi di chiusura.

Per i numeri decimali adoperare virgole e mai punti, così nel testo come nelle tabelle.

Adoperare sempre le seguenti abbreviazioni:

chilogrammo = Kg	metro = m	centim. quadr = cmq	minuto se- condo = sec
ettogrammo = hg	decimetro = dm	millim. quadr = mmq	
grammo = g	centimetro = cm		
decigrammo = dg	millimetro = mm	litro = l	per cento = %
centigrammo = cg	micron = μ	centim. cubo = cc	per mille = ‰
milligrammo = mg		ora = h	normale = N
millesimo di grammo = γ	metro quadr = mq	minuto primo = min	decimo norm = 0, IN ph, Ph ecc. = pH

(tutti questi segni sempre senza punto)

Le formule chimiche devono essere scritte con gli indici in basso. Es. CaCl_2

S O M M A R I O

	PAGINA
V. SCARDOVI - Un nuovo solfo-batterio fotosintetizzante: <i>Rhodopseudomonas vannielii</i> n. sp.	77
E. CORBERI - Nuove forme di <i>Eutorulopsis dubia</i> Cif. et Red.- Nota II	103
E. CORBERI - Ancora su nuove forme di <i>Eutorulopsis dubia</i> Cif. et Red. Nota III	109

Prezzo di Abbonamento per ogni volume (costituito di 6 fascicoli)
ITALIA L. 2000 ESTERO L. 3000 - UN FASCICOLO SEPARATO L. 350

Direttore responsabile, Prof. C. ARNAUDI

Un nuovo
solfo-batterio fotosintetizzante
***Rhodopseudomonas vannielii* n. sp.**

Vittorio Scardovi

INTRODUZIONE

Lo studio delle attività fisiologiche e biochimiche delle forme appartenenti al gruppo dei solfobatteri pigmentati fotosintetizzanti è stato fecondo di risultati veramente preziosi, non soltanto per la conoscenza delle attività batteriche in genere, ma anche per la comprensione più estesa e profonda dell'analogo processo di fotosintesi che avvicina queste forme batteriche alle piante clorofillate. Se da un lato le linee fondamentali del biochimismo di talune specie di questo gruppo sono state chiaramente delineate dagli accurati studi di autori quali van Niel (1931), Müller (1933), Foster (1940) e altri, numerosissime altre particolarità fisiologiche e biochimiche attendono ancora l'indagine dello studioso per essere poste in luce. I recenti studi di Hutner (1944, 1946) e quelli recentissimi di Gest e Kamen (1948, 1949) dedicati, i primi, all'indagine sulla natura dei fattori di crescita indispensabili allo sviluppo di talune forme ed, i secondi, allo studio, tra l'altro, di attività biochimiche quali utilizzazione dei composti del fosforo, attività nitroenasica, produzione fotochimica di idrogeno e fissazione dell'azoto molecolare, sono un chiaro indice del non sopito, anzi, rinnovato interesse allo studio di questo gruppo batterico.

I risultati però di questi studi trovano, nel limitato numero di specie fino ad ora isolate in coltura pura, un ostacolo notevole ad una loro generalizzazione. Se è certo infatti, che il processo di fotosintesi, che queste forme batteriche mostrano di poter compiere, ne costituisce caratteristica fisiologica comune, è altrettanto certo che proprietà biochimiche quali produzione di idrogeno (Roelofsen 1935, Nakamura 1937, Scardovi 1946, Gest e Kamen 1948), riduzione dei nitrati (Nakamura 1937, Scardovi inedito), utilizzazione di composti inorganici dello solfa (van Niel 1931) e di composti organici sono ben lungi dall'essere possedute non solo dalle singole specie studiate ma anche da ceppi riferibili alla medesima specie.

L'isolamento in coltura pura di una specie nuova, di cui la validità è documentata nella presente nota, offre la possibilità, con l'accrescere il numero delle specie isolate, di estendere le odierne conoscenze circa

le attività fisiologiche e biochimiche delle forme batteriche comprese in questo gruppo di microorganismi. L'istituzione di questa nuova specie ha riflessi però più immediati sulla sistematica del gruppo medesimo, che pure risente gravemente della precaria situazione insita nel ristretto numero di specie fino ad oggi isolate in coltura pura; riflessi più immediati, poichè alle attività fisiologiche e biochimiche della nuova specie non sono state ancora dedicate indagini sperimentali sufficienti a metterne in luce i molteplici aspetti. Allo scopo di chiarire meglio in seguito la posizione sistematica della nuova specie e quegli emendamenti che il riconoscimento di questa rende desiderabile siano apportati alla odierna classificazione, è indispensabile far precedere alla descrizione dei caratteri della specie alcuni cenni storici circa la sistematica dei solfobatteri pigmentati fotosintetizzanti.

Gli studi di Winogradsky (1887, 1888) su forme batteriche pigmentate di larghe dimensioni e ricche di inclusioni di solfa elementare ed il riconoscimento di una particolare forma di metabolismo nel quale l'energia era derivata, secondo l'opinione dell'A, dalla ossidazione di composti inorganici dello solfo in ambiente puramente minerale, carattere fisiologico pure posseduto da microorganismi non pigmentati e diffusi largamente nelle acque solfuree, inducono Migula (1900) ad istituire l'ordine *Thiobacteria*, comprendente ambedue questi gruppi di microorganismi, incolori gli uni, pigmentati gli altri. Carattere morfologico comune è considerato da Migula la presenza nell'interno della cellula di solfa elementare sotto forma di inclusioni. Nell'ordine da lui costituito, Migula distingue la famiglia delle *Beggiatoaceae* per le forme incolori e la famiglia delle *Rhodobacteriaceae* per quelle pigmentate.

La precarietà però di un simile schema si mostra ben presto in tutta la sua evidenza. Già nel 1897 Miyoshi aveva trovato una forma batterica incolore che, pur fisiologicamente identica ai solfobatteri classificati da Migula, non poteva essere inclusa nell'ordine, mancando delle tipiche inclusioni solforose ma depositando lo solfa soltanto all'esterno della cellula. Per un motivo analogo i vari microorganismi scoperti e studiati da vari autori nei primi anni del secolo, tra i quali Nathanson, Jacobsen, Beijerinck, Lieske, raccolti poi sotto la denominazione generica di *Thiobacillus*, non potevano, pur possedendo lo stesso tipo fondamentale di metabolismo, rientrare in questo gruppo batterico.

Molisch, nel 1907, descrive un gruppo particolare di microorganismi che, pur non potendo sviluppare in mezzi puramente inorganici e non potendo perciò essere considerati « solfo-batteri » nel senso dato da Winogradsky e da Migula a questa espressione, vengono riconosciuti dall'A, sulla base della loro pigmentazione, come forme batteriche intimamente connesse alle *Rhodobacteriaceae* di Migula. Un nuovo ordine, *Rhodobacteria*, viene così istituito da Molisch, nel quale l'A comprende la famiglia delle *Rhodobacteriaceae* Migula sotto la nuova denominazione di *Thiorhodaceae* e la famiglia delle *Athiorhodaceae*, distinguibili per la presenza o meno di solfa elementare nell'interno della cellula. Nessuna particolare menzione è fatta però da Molisch circa la posizione dei solfobatteri incolori (*Beggiatoaceae* Migula).

Nel 1917 Buchanan propone la creazione dell'ordine *Thiobacteriales* comprendente tutti i vari gruppi di solfobatteri classificati da Migula e da Molisch.

I criteri che avevano prima guidato questi ultimi autori, l'uno cioè il criterio della presenza di inclusioni solforose e l'altro il criterio della pigmentazione, sono entrambi seguiti da Buchanan: le forme batteriche riferibili all'ordine nuovo possono infatti possedere solfo o batterioporporina od ambedue e « *usually (are) growing best in the presence of hydrogen sulphide* ». La mancanza della pigmentazione che aveva indotto Molisch a separare i solfo-batteri incolori dal suo ordine *Rhodobacteria*, è sostituita, nel disegno di Buchanan, dalla presenza dello solfo intracellulare quale carattere di equivalente importanza tassonomica senza evidentemente ragione plausibile. Osserva molto acutamente van Niel (1944, pag. 76) a tale proposito all'estrema illogicità dell'uso di due caratteri completamente indipendenti ma presenti insieme in un solo tipo (*Thiorhodaceae*) per stabilire relazioni tra gruppi (solfobatteri incolori e *Athiorhodaceae*) che tali caratteri posseggono separatamente.

Lo schema di Buchanan incontra comunque larghi consensi tanto da essere integralmente riportato nelle successive edizioni del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. L'ordine *Thiobacteriales* veniva così, in succinto, suddiviso:

Famiglia I: RHODOBACTERIACEAE Migula; *cellule contenenti batterioporporina; con o senza solfo.*

Sotto-famiglia I: *Chromatioideae; cellule contenenti solfo.*

Sotto-famiglia II: *Rhodobacterioideae; cellule prive di solfo.*

Famiglia II: BEGGIATOACEAE Migula; *cellule filamentose contenenti solfo ma non pigmentate.*

Famiglia III: ACHROMATIACEAE Buchanan; *forme unicellulari mobili non filamentose contenenti solfo ma non pigmentate.*

Non appaia strano che, malgrado la tendenza ben palese di questi autori a fondare la creazione di questi larghi batterici sopra caratteri fisiologici più che morfologici, non si faccia cenno espressamente al carattere peculiare di gran parte di questi microorganismi, cioè al loro metabolismo fotosintetizzante.

Le opinioni circa il metabolismo di queste forme batteriche erano a quel tempo ancora ben lontane dal trovare unanime consenso presso gli studiosi.

Da un lato, infatti, le ricerche di Winogradsky davano fondato motivo a ritenere, quale carattere biochimico comune, la facoltà di sviluppo chemio-sintetico a spese della ossidazione di composti dello solfo mediante l'ossigeno, elemento fornito, nel caso delle *Rhodobacteriaceae* Migula (solfo-batteri pigmentati) dal contemporaneo sviluppo, nei substrati colturali, di microorganismi clorofillati (alghe) e perciò produttori l'ossigeno necessario alla ossidazione; dall'altro Molisch (1907) rifiuta il

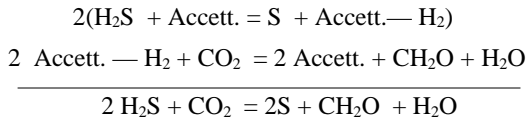
concetto di chemio-sintesi, poichè gli organismi da lui studiati non sviluppano che in presenza di sostanze organiche. Il tentativo però fatto da Molisch di dimostrare l'attività fotosintetizzante delle sue colture, sulla base della produzione di ossigeno, porta a risultati completamente negativi.

Molisch, pure oscuramente, si rende conto che « *die Ernährungsversuche mit Purpurbakterien uns mit einer neuen Art von Photosynthese bekannt gemacht haben, bei der organische Substanz im Licht assimiliert wird* ».

Il superamento di questa incerta situazione è grande merito di Buder, il quale nel 1919 afferma che, per i microorganismi studiati da Winogradsky (batteri pigmentati contenenti solfo), tanto i composti dello solfo quanto l'energia luminosa sono elementi fondamentali e che perciò hanno luogo sia processi di chemiosintesi che di fotosintesi, a seconda della sorgente di energia. Ma quale di queste due sorgenti di energia è effettivamente utilizzata per il normale sviluppo? La presenza contemporanea di composti dello solfo e di energia luminosa sono condizioni indispensabili perchè lo sviluppo abbia luogo, asserisce poco dopo Bavendamm (1924), senza peraltro rendere ragione del come fotosintesi e chemiosintesi possano essere così intimamente legate tra di loro.

Kluyver e Donker, nel 1926, estendono alla generalità dei processi biochimici le idee di Wieland sul trasferimento dell'idrogeno nei fenomeni ossido-riduttivi, formulando un concetto dimostratosi poi di una validità inoppugnabile: « *wenn man diese Betrachtungsweise (Wieland) einmal akzeptiert, fällt aber die Notwendigkeit das der Akzeptor bei der Dehydrierung des Schwefelwasserstoff oder des Schwefels gerade Sauerstoff sein soll weg; denn das kann ebensogut irgendeine andere Akzeptor im Spiele sein* ».

Questo concetto, di generale validità, è formulato nel modo seguente:



Verrà accennato più oltre alla importanza preminente di tale schema nell'informare gli studi recenti sulle attività biochimiche dell'intero gruppo dei solfobatteri pigmentati, studi che hanno condotto al palese riconoscimento dell'uniformità delle attività biochimiche di tale gruppo di microorganismi.

E' logico che il graduale progresso degli studi ed il continuo allargarsi delle conoscenze sul metabolismo di queste forme dovesse informare di sè il pensiero degli studiosi di tassonomia batterica.

Frattanto, dopo Buchanan, il primo e più autorevole studioso che abbia posto in evidenza la eccezionale disparità morfologica delle forme batteriche incluse da Buchanan nel suo ordine, è Pringsheim, il quale, nel 1923, dopo una severa valutazione di ciò che autori precedenti e lui

medesimo avevano posto in luce circa gli strettissimi rapporti tra i rappresentanti della famiglia delle *Beggiatoaceae* e *Achromatiaceae* da una parte e le forme comunemente incluse tra le *Myxophyceae* dall'altra, toglie dall'ordine istituito da Buchanan i solfo batteri incolori, raggruppando gli altri nel nuovo ordine *Rhodobacterales*, dividendo in questo le due famiglie Rhodobacterinae e Thiorhodinae. Ai solfobatteri incolori in seguito, malgrado che nelle edizioni del Bergey's Manual e nella prima classificazione di Pribram (1929) siano ancora inclusi, con i solfo batteri pigmentati, nello stesso ordine, sarà riconosciuta una completa indipendenza morfologica e classificati secondo criteri sui quali non è il caso qui di riferire.

Nel 1931 van Niel pubblica il primo dei suoi fondamentali lavori riguardanti la morfologia e la fisiologia dei solfobatteri pigmentati. Usando ceppi isolati in coltura sicuramente pura e riferibili, per la loro morfologia, al tipo *Chromatium* e *Thiocystis*, dimostra irrefutabilmente, sulla guida degli schemi suggeriti da Kluver e Donker (1926) la capacità posseduta da queste forme batteriche d'operare un completo processo di fotosintesi, nel quale composti dello solfo tipo H_2S assolvono la funzione di H-donatori per la riduzione (organicazione) dell'anidride carbonica. Dimostra inoltre lo stesso A. che tutti i ceppi da lui isolati posseggono pure la facoltà di svilupparsi in mezzi organici in assenza di composti ossidabili dello solfo, mostrandosi così indistinguibili, sulla base di questo ultimo carattere fisiologico, dalle forme batteriche scoperte e studiate da Molisch.

La capacità però di svilupparsi in condizioni di completa autotrofia non è però comune ai due gruppi così che, afferma van Niel (1931, pag. 104) « *as the matter stands at the present time Thiorhodaceae and Athiorhodaceae (Thiorhodinae e Rhodobacterinae Pringsheim) are clearly distinguishable because only the representatives of the first group can develop autotrophically... none of the Athiorhodaceae studied so far grows in a purely mineral medium* ».

Stabilita la funzione esercitata dai pigmenti cellulari ed il tipo metabolico fondamentale dei solfobatteri pigmentati, contenenti o meno inclusioni solforose, l'ordine *Rhodobacterales* stabilito da Pringsheim (*Rhodobacteria* Molish) previa esclusione dall'ordine precedente *Thiobacterales* Buchanan delle forme non pigmentate, viene ad acquistare, oltre alla maggiore uniformità morfologica quale era nelle finalità di Pringsheim, una straordinaria uniformità anche quale gruppo fisiologico.

Nel 1933 però tale indubbia uniformità fisiologica non è considerata da Pribram criterio sufficiente per mantenere a tale gruppo il valore di ordine ed i suoi componenti sono infatti, nella sua rigidamente morfologica classificazione, distribuiti in tre dei quattro sott'ordini della sottoclasse *Algobacteria*, accanto alle forme incolori morfologicamente simili.

I risultati ai quali Pribram è condotto dall'applicazione indiscriminata di criteri puramente morfologici (nella distinzione dei gruppi tas-

onomici minori) non sono accettabili, ed i più moderni sistematici sono portati ad una più attenta valutazione dei criteri morfologici e fisiologici nell'intento di attribuire loro un più esatto valore quali principi informatori nella classificazione degli Schizomiceti.

I recenti progressi nello studio delle funzionalità batteriche cominciano già a porre in evidenza come sia spesso ben difficile separare nettamente un tipo metabolico da un altro, onde, affermano Kluyver e van Niel (1936, pag. 372) « un'accurata analisi dei processi catabolici ha posto in evidenza la loro fondamentale unità ed ha reso possibile stabilire un rapporto causale tra le differenze osservate e differenze di natura quantitativa in qualche speciale proprietà della cellula vivente. Questa *quantitative gradation* implica il fatto che pure i gruppi fisiologici non manifestino linee nette di separazione gli uni dagli altri».

L'uso invero lodevolmente temperato di caratteri morfologici in primo luogo, per la definizione dei gruppi più ampi (famiglie), e dei caratteri fisiologici, per la definizione dei generi, porta gli AA. citati ad una suddivisione della classe Eubacteriales, nella quale i solfobatteri pigmentati vengono distribuiti nelle rispettive famiglie morfologiche (*Pseudomonadaceae* e *Micrococcaceae*) formando i generi a metabolismo fotosintetizzante.

Tale separazione non è però mantenuta da Stanier e van Niel (1941) i quali riuniscono nuovamente i solfobatteri pigmentati nell'ordine *Rhodobacteriales* Pringsheim, ponendolo accanto all'ordine *Eubacteriales* e *Actinomycetales* nella classe *Eubacteriae* pur riconoscendo che (pag. 459) « questa sistemazione è lontana dall'essere soddisfacente... gli ordini così creati non sono affatto equivalenti, poichè i batteri fotosintetizzanti sono distinguibili da certi generi dell'ordine *Eubacteriales* unicamente in base a caratteri fisiologici mentre l'ordine *Actinomycetales* costituisce una unità morfologicamente caratterizzata ».

Gli studi fisiologici di Foster (1940), van Niel (1944) e altri chiariscono frattanto sempre meglio le attività fisiologiche e biochimiche dei solfobatteri fotosintetizzanti.

Foster (loc. cit.) dimostra in modo inequivocabile come talune sostanze organiche agiscano, nel processo di fotosintesi realizzato da certe specie della famiglia delle *Athiorhodaceae*, unicamente come H-donatori (particolarmente gli alcoli secondari), la formazione di materiale plastico essendo funzione esclusiva dell'anidride carbonica ridotta per effetto di tale reazione ossido-riduttiva.

Van Niel (1944) dimostra come numerose specie appartenenti alla medesima famiglia siano capaci di sviluppare, purchè il mezzo sia adeguatamente fornito di fattori di crescita, utilizzando quali H-donatori per la riduzione dell'anidride carbonica gli stessi composti dello zolfo, utilizzati, in ambiente puramente minerale dai rappresentanti l'altra famiglia delle *Thiorhodaceae*.

Viene così a perdere valore un carattere già considerato in passato come

basilare per la differenziazione delle specie appartenenti alle due citate famiglie. Rimane però, ed è importante che ciò venga posto in rilievo, quale carattere fisiologico distintivo delle specie appartenenti alle *Thiorhodaceae*, la possibilità di uno sviluppo completamente autotrofo, potendo queste svilupparsi in ambiente puramente minerale. Van Niel (1944 pag. 52) fa notare però a tal proposito che « l'interpretazione, nel senso più stretto, del termine *autotrofo* implica una completa indipendenza da altri organismi viventi, vale a dire, una nutrizione completamente minerale. In questo senso le *Athiorhodaceae*... non sono autografe. Ma il termine è stato spesso adoperato e non senza giustificazione, per indicare organismi capaci di utilizzare l'anidride carbonica per la sintesi dei costituenti cellulari. Su tale base però è del tutto insoddisfacente descrivere come autotrofa una forma batterica capace di sviluppare in ambiente puramente minerale a spese di un'ossidazione dell'idrogeno, per esempio, e come eterotrofa invece un'altra forma batterica strettamente simile alla prima, unicamente per il fatto che per lo sviluppo di quest'ultima è necessaria la presenza di 1 µg di biotina... ». A proposito del processo di fotosintesi, processo che distingue dagli altri l'intero gruppo dei solfo-batteri pigmentati, così si esprime più oltre lo stesso autore (1944, pag. 80) « while far the moment photosynthesis may appear to be an utterly distinctive process, future developments in our understanding of the photosynthetic process, may well obliterate this ».

Van Niel (1944) ritorna perciò ai concetti che lo avevano guidato, insieme con Kluyver, nella formulazione sistematica del 1936, proponendo però la istituzione di un ordine nuovo, *Pseudomonadales*, in luogo dell'ordine *Rhodobacterales*, per comprendere, nelle famiglie di tale ordine, *Pseudomonadaceae* e *Spirillaceae*, i batteri pigmentati fotosintetizzanti, accanto alle forme incolori, morfologicamente identiche, già quivi classificate. Chiavi sistematiche aggiuntive permettono poi, su basi fisiologiche, la netta distinzione tra forme fotosintetizzanti e forme incolori non fotosintetizzanti.

Un quesito però di non secondaria importanza sorge spontaneamente: quali sono i generi che, compresi prima nell'ordine *Rhodobacterales*, dovrebbero, secondo quanto suggerisce van Niel, essere ripartiti nelle due famiglie del nuovo ordine *Pseudomonadales*? L'A. citato non si esprime specificatamente in proposito, ma è chiaro intenda riferirsi ai generi ed alle specie compresi nella famiglia delle *Athiorhodaceae*, che, nel modo più palese e immediato, trovano nelle famiglie *Pseudomonadaceae* e *Spirillaceae* le forme incolori loro corrispondenti dal punto di vista morfologico.

Che l'inclusione delle forme contenenti solfo nell'ordine *Pseudomonadales* sia tacitamente affermata da van Niel, come riferisce Pringsheim (1949, pag. 81) è molto probabile, soprattutto se si tiene conto come già nello schema di Kluyver e van Niel, generi come *Thiopedia*, *Thiothece*, *Thioplycoccus*, *Thiospirillum* e *Chromatium*, erano stati inclusi nelle rispettive tribù morfologiche delle famiglie *Pseudomonadaceae* e *Micrococcaceae*. Fa osservare molto a proposito Pringsheim che una ripartizione

totale delle specie comprese nel gruppo dei solfobatteri pigmentati contenenti solfo (Fam. *Thiorhodaceae*) nell'ordine *Pseudomonadales*, la cui costituzione del resto raccoglie il suo favore, urterebbe contro evidenti ostacoli di natura morfologica la somiglianza morfologica tra generi quali *Thiopedia*, *Thiodictyon*, *Amoebobacter* e le *Myxophyceae* è infatti talmente singolare, afferma Pringsheim, da rendere poco fondata tale attribuzione. Sebbene l'A. citato non si pronunciasse al proposito, è giustificato pensare che l'introduzione nell'ordine *Pseudomonadales* dei generi *Thiospirillum* e *Chromatium*, in virtù della loro mobilità per flagelli e dei loro molto meno stretti rapporti morfologici con le *Myxophyceae* non debba incontrare difficoltà.

E' strano però che Pringsheim, dopo aver riportato che, secondo van Niel, « *the storage of sulphur in the cells is also not quite as distinctive a feature as was previously believed* » affermi (1949, pag. 82) che « *there would be two independent groups of purple-bacteria, viz., I.-Rhodopseudomonadaceae, with the subfamilies Athiorhodeae and Thiorhodeae, differing in the deposition of sulfur outside or inside the cells and in the ability of the latter to live autotrophically; II.-Amoebobacteriaceae, sharing with the Thiorhodeae the storage of sulfur but awaiting investigation as regards their pigmentation and mode of nutrition. The latter family would perhaps be related to the Cyanochloridinae* ».

A parte la non validità del carattere differenziale rappresentato dalla deposizione o meno dello solfo all'interno della cellula (van Niel, 1931), Pringsheim ritiene ancora il criterio dello sviluppo autotrofo valido a separare le due sottofamiglie! Dopo quanto è affermato da van Niel (1944, pag. 49) che « *one must admit the possibility that certain species of Athiorhodaceae will be discovered which can develop in the absence of special organic growth factor* » è pienamente giustificato ritenere che, qualora tali specie siano conosciute, il criterio della autotrofia in senso stretto debba essere a maggior ragione abbandonato quale elemento distintivo di raggruppamenti sistematici di tale ampiezza (vedi Conclusioni).

Gli schemi proposti dai citati studiosi di sistematica, a modifica di quanto Buchanan aveva formulato nel 1917, vengono in parte accolti soltanto nell'ultima edizione (1948) del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. L'ordine *Thiobacteriales* Buchanan, mantenuto in tutte le edizioni precedenti nella formulazione e suddivisione primitiva, viene infatti smembrato e due delle famiglie quivi incluse e cioè *Beggiatoaceae* e *Achromatiaceae* sono trasferite nell'ordine *Chlamydo bacteriales*.

Per la classificazione delle specie batteriche in tal modo rimaste nell'ordine *Thiobacteriales* (*Rhodobacteriaceae* Migula emend. Buchanan) due erano i criteri che potevano o meno essere seguiti: distribuire i generi dei solfobatteri pigmentati nelle varie famiglie morfologiche sia dell'ordine *Eubacteriales* (Kluyver e van Niel, 1946) sia del nuovo ordine *Pseudomonadales* suggerito da van Niel (1944), oppure raccogliergli nell'ordine *Rhodobacteriales* Pringsheim e mantenere tale ordine separato dall'ordine *Eubacteriales* in virtù delle peculiari caratteristiche fisiologi-

che di tali forme batteriche (Stanier e van Niel, 1941). L'istituzione nell'ordine *Eubacteriales* del sott'ordine *Rhodobacterineae* come suggerito da Breed Murray e Hitchens e come è riportato nell'ultima edizione del Manuale (1948), segue evidentemente ambedue i criteri esposti. Si vuole infatti con tale risoluzione mettere in evidenza come da un lato, i caratteri morfologici di queste forme batteriche ne rendano indubbio il riferimento all'ordine *Eubacteriales* e come dall'altro i caratteri fisiologici (attività fotosintetizzante) siano tuttavia tali da rendere valida la loro separazione in un sott'ordine distinto dalle forme batteriche incolori non fotosintetizzanti.

L'inclusione poi nel nuovo sott'ordine della famiglia delle *Chlorobacteriaceae*, la cui suddivisione in generi è riconosciuta a dire il vero improntata ad un carattere strettamente provvisorio pare ancora molto prematura. Pringsheim infatti, dopo aver affermato che (1949, pag. 80) « *the only species of Chlorobacteriaceae so far thoroughly investigated is the Chlorobium limicola of van Niel... who inclines to the belief that all Green Bacteria belong to it, but this is unlikely to be correct* » sembra propenso a riconoscere nella specie descritta da Czurcla e Maresch (1937) sotto il nome generico di *Chloropseudomonas* quei caratteri morfologici (specie mobilità per flagello polare e forma a bastoncello relativamente stabile) che ne giustifichino l'appartenenza alle vere forme batteriche (*Eubacteriales*). Scarse sono ancora le nostre conoscenze circa i generi e le specie della famiglia *Chlorohacteriaceae* per potere formulare di tale famiglia un adeguato schema sistematico; se questa debba limitarsi a comprendere, e l'inclusione odierna nell'ordine *Eubacteriales* ne rende sentita la necessità, forme che, come la *Chloropseudomonas* Czurda e Maresch siano morfologicamente e non soltanto fisiologicamente (van Niel, 1944) riferibili ai veri batteri, è questione che sarà possibile risolvere in futuro con l'allargarsi delle conoscenze su tale gruppo batterico.

La separazione nel sott'ordine *Rhodobacterineae* delle due altre famiglie (*Athiorhodaceae* e *Thiorhodaceae*) è comunque un problema del quale si rende attuale un riesame in seguito all'istituzione della nuova specie.

DESCRIZIONE DELLA SPECIE

Origine. - Durante i tentativi di purificazione di un ceppo di *Chromatium*, da riferirsi con tutta probabilità alla specie *C. minutissimum* Winogradsky (Scardovi, 1946), si notò la comparsa di coloniette rosso violacee che, all'esame microscopico, risultarono costituite di cellule del tuttodiverse da quelle riferibili al genere *Chromatium*. Il batterio, sviluppatosi alla luce ed in un substrato privo di sostanze organiche quale quello impiegato per la coltura del *Chromatium*, fece pensare alla fortuita comparsa di una forma interessante, per il suo metabolismo, lo studio fisiologico dei solfobatteri fotosintetizzanti in corso sopra il ceppo di *Chromatium*.

La forma batterica venne pertanto isolata e ne furono studiati i caratteri morfologici e fisiologici la cui descrizione è oggetto della presente nota.

METODI DI CULTURA

Il substrato impiegato per la moltiplicazione ed il mantenimento del ceppo batterico, substrato nel quale tale forma viene tuttora coltivata, è del tutto simile a quello impiegato da van Niel (1931) per la coltura dei solfobatteri appartenenti alla famiglia delle *Thiorhodaceae*: NaHCO₃ g 0,5, NH₄CL g 0,2, MgCl₂ g 0,05, KH₂PO₄ g 0,05, Na₂S.9 H₂O g 0,1, acqua di fonte cc. 100, agar-agar g 2.

Le modalità di preparazione, sterilizzazione, allestimento della coltura in tubo verticale con chiusura anaerobica a mezzo di paraffina sterile sono quelle entrate ormai nella metodica comunemente seguita nello studio di tale gruppo batterico. (Van Niel, 1931). La concentrazione idrogenionica del substrato è mantenuta però intorno al valore di 6 mediante l'aggiunta di acido solforico o fosforico, poichè è ad un tale valore di pH che si ottiene lo sviluppo più rapido ed abbondante. Le colture sono incubate in termostato munito di sorgente luminosa (lampada elettrica da 25/40 watt) alla temperatura di 20°-22° C (temperature più elevate quali 25°-27° C rallentano od inibiscono completamente lo sviluppo).

I substrati nei quali il solfuro di sodio è stato sostituito da altri composti inorganici od organici sono stati preparati con i medesimi composti minerali alle stesse concentrazioni del substrato di cui sopra (Substrato Standard). Particolarmente ottimi essendo risultati i substrati aggiunti di autolizzato di lievito, si è avuto cura di impiegare sempre il medesimo autolizzato di lievito, preparato secondo Bernhauer, (1935) in tutte le ricerche colturali qui riferite. Tale autolizzato, che sarà chiamato per semplicità autolizzato « *Normale* », sottoposto ad alcune determinazioni analitiche ha dato i valori che seguono:

Peso specifico a 15° C	1,1246
Sostanza secca (residuo a 105° C)	1,35% (P/P)
Solfo totale (Metodo di Raistrick, 1948)	0,007% (P/V)
Solfo totale (% sost. secca)	0,48

Lo studio delle principali caratteristiche fisiologiche è stato effettuato sia con substrato liquido in recipienti di vetro colmi e chiusi con tappo di vetro, sia con colture agarizzate in tubo verticale, avendo cura di realizzare condizioni di completa sterilità ed effettuando all'occorrenza controlli culturali in brodo-agar in condizioni aerobiche ed anaerobiche per accertare l'assenza di forme inquinanti.

Occorre osservare che l'impiego delle colture in tubo verticale con substrato agarizzato è apparso, in taluni casi, vantaggioso se non addirittura indispensabile, poichè, talvolta, nelle colture in recipiente chiuso, le condizioni anaerobiche sono troppo strette per permettere lo sviluppo; è infatti risultato chiaro che il comportamento della forma batterica qui descritta di fronte all'ossigeno, è largamente influenzato dalla composizione del mezzo. Il vantaggio della coltura in tubo è in tali casi evidente, poichè gli strati del mezzo culturale passano gradualmente da condizioni di scarsa anaerobicità nelle parti superiori del tubo, ad una anaerobicità piuttosto stretta verso il fondo del tubo medesimo. Vantaggio non trascurabile è poi quello di permettere un controllo più accurato dell'assenza di germi inquinanti, controllo assai difficile nelle colture liquide in recipiente chiuso.

MORFOLOGIA IN SUBSTRATO INORGANICO

Morfologia della colonia. — Mentre la forma delle colonie, sferica od ellissoide, o leggermente lobata, non risente gran che delle variazioni nelle condizioni culturali, il loro colore e l'entità della deposizione di solfo nelle immediate vicinanze della colonia stessa risentono tali influenze in modo nettissimo. Nelle parti inferiori del tubo, l'inizio dello sviluppo si rende infatti manifesto con la comparsa di un alone opaco dovuto alla separazione di granuli di solfo in seno al mezzo, tutto attorno alla colonia in via di formazione e tale alone di solfo è persistente. Il colore di queste colonie profonde è giallo verdastro. Nelle parti del substrato più superficiali, ed il passaggio è per lo più molto netto, non si nota mai comparsa di alone di solfo ed il colore della colonia presenta invece una bella tonalità rosso violetta intensa; il colore va poi affievolendosi con il diminuire dello sviluppo nelle colonie superficiali. Lo sviluppo manca in un più o meno spesso strato superficiale. Le colonie profonde sono molto più compatte delle colonie superficiali e si lasciano con difficoltà disintegrare quando si vogliono effettuare passaggi in nuovo substrato o per l'esame microscopico; tale diversa compattezza è in rapporto con la struttura cellulare profondamente diversa nei due casi.

Morfologia cellulare. - Le colonie profonde nelle colture con substrato inorganico agarizzato contenenti il 0,1 % di solfuro ed a pH 6, sono formate da cellule molto allungate ed esili per lo più con estremi appuntiti di lunghezza variabile da 5-6 μ a 12-14 e più μ e di spessore massimo di 0,5 μ . L'estremità delle cellule si presenta così uniformemente affilata in tutte le cellule da richiamare l'aspetto delle Cytophaga. Il

diametro però delle singole cellule non è costante ma, cambia di tratto in tratto così da dare l'impressione che, anzichè di una sola, si tratti di molte cellule rimaste congiunte dopo la divisione. Analogo aspetto presentano le cellule sviluppate nelle colture liquide in recipiente chiuso allestite con il medesimo substrato. Degno di nota il fatto che in tali condizioni, presenza cioè di solfuro e notevole anaerobicità, le cellule sono immobili in tutti gli stadi di sviluppo.

Una particolarità morfologica, osservabile già a fresco, ma resa più evidente nei suoi dettagli dall'esame in campo oscuro, merita una più attenta descrizione.

Mentre il contenuto delle cellule giovani (24 ore) si manifesta uniforme in tutto il corpo cellulare, in quelle di maggiore età si osservano curiosi ingrossamenti, risultati dall'addensarsi del citoplasma in una o più parti del corpo cellulare. Tali addensamenti citoplasmatici, visibili nei fotogrammi riportati in fondo alla presente nota, sono più o meno numerosi, ora polari ora centrali. L'esame in campo oscuro permette di rilevare particolari maggiori: le cellule giovanissime non presentano nel loro interno alcuna inclusione e la loro membrana appare uniformemente rifrangente; prestissimo la rifrangenza della parte esterna della cellula si perde e, mentre in taluni individui si nota soltanto un sottile e non rifrangente strato periferico, nella maggior parte delle cellule si notano invece inspessimenti a forma di anello, a diretto contatto con la membrana, formati da sostanza citoplasmatica, come è reso evidente dalla loro evoluzione successiva. Si nota, infatti, dapprima, un restringimento delle loro porzioni estreme fino alla saldatura dei loro bordi in modo da formare dei corpiccioli più o meno cavi all'interno; in un secondo tempo tali corpiccioli si restringono, si staccano dalla membrana cellulare, che appare allora sottilissima ed appena visibile, e formano granulazioni di forma più o meno sferica e di dimensioni varie. Nelle colonie di 10-15 giorni di età tutte le cellule, all'osservazione in campo oscuro, mostrano tale aspetto morfologico che conservano poi in seguito (2 mesi e più) (fig. n. 1).

Non sono mai state notate, anche in vecchie colture, cellule globose o di forma diversa da quella descritta.

Un quadro morfologico del tutto diverso presentano invece le cellule delle colonie superficiali: le cellule sono di dimensioni ridottissime, superando molto raramente il micron di lunghezza, sempre diritte, spesso dotate di buona mobilità e quasi sempre prive delle inclusioni sopra descritte. Non va taciuto però che una distinzione netta tra i due quadri morfologici è ottenibile considerando colonie in condizioni di anaerobicità ben diverse tra loro, poichè le colonie degli strati di coltura intermedi presentano pure aspetto morfologico intermedio. Un cenno particolare merita la comparsa di inclusioni di solfo nell'interno delle cellule. In tutte le colonie profonde, circondate da aloni di solfo ben evidente, è sempre possibile trovare, specie nel primo periodo di sviluppo, cellule contenenti tali inclusioni, facilmente riconoscibili dallo spiccato potere rifrangente all'esame microscopico,

E' opportuno osservare che le granulazioni cui sopra si è accennato non hanno nulla in comune con le inclusioni di solfa e sono da queste ben distinguibili. Tali inclusioni si presentano sia sotto l'aspetto di granuli sferici, così comuni nei rappresentanti della famiglia delle *Thiorhodaceae* (*Chromatium* etc.), in posizione centrale o terminale della cellula ed in numero vario da 1 a 4-5 per cellula, sia sotto forma di inclusioni più vistose che, a causa del ristretto spazio cellulare, si allungano fino ad occupare oltre metà della cellula, leggermente rigonfia in corrispondenza della inclusiones stessa. Taluni aspetti di queste inclusioni sono riportati nelle riproduzioni in fondo al testo (fig. n. 2).

La presenza dello solfo nell'interno della cellula deve essere considerata come attributo normale della forma batterica qui descritta, se pure limitata ad un breve periodo dello sviluppo ed in stretto rapporto con particolari condizioni di ambiente tra le quali in primo luogo il grado di anaerobicità del mezzo colturale. Nelle cellule, comunque, delle colonie superficiali non si ha mai comparsa di inclusioni. E' superfluo accennare al fatto che, oltre allo solfo endocellulare, è presente pure abbondante solfo extracellulare, osservabile, come già si è accennato, specie nelle colonie profonde della coltura e nelle colture in recipiente chiuso allestite con il medesimo substrato liquido.

MORFOLOGIA IN SUBSTRATO ORGANICO

Impiegando un substrato costituito dal 95 % in volume di soluzione inorganica « *Standard* » e dal 5 % di autolizzato « *Normale* » di lievito (equivalente a circa mg 70 di sostanza secca) ed ad un pH di 6,5, si ottengono, in recipienti chiusi con tappo di vetro, sviluppi ottimi, previa incubazione alla luce ed alla temperatura di 20°-22° C (l'aggiunta di piccole quantità di Na₂S per rendere maggiormente anaerobico il liquido colturale è superflua!).

In tali condizioni, l'aspetto morfologico delle cellule è di gran lunga più uniforme di quello presentato dalle colture in mezzo inorganico: le cellule, prive sempre di inclusioni di qualunque tipo, si presentano piccole, della lunghezza massima di 1,5 μ, molto sottili, sempre diritte, molto attivamente mobili, isolate e mai ramificate. L'aspetto delle cellule non cambia, se si eccettua la comparsa di forme leggermente più allungate dopo 8-10 giorni dall'inizio dello sviluppo. Il substrato non diventa mai vischioso nè l'esame microscopico rivela presenza di capsule.

Il deposito che si forma al fondo dei recipienti è sempre polverulento e le cellule non formano ammassi. Il liquido, dopo la deposizione delle cellule, manifesta un colore rosa pallido. Il colore delle colture, in tali condizioni, si mantiene abbastanza costante ma varia di intensità con il variare della massa microbica. Le colture giovani presentano, usando i termini del codice di Ridgway, una colorazione « *shell pink* » che diviene in seguito « *light salmon orange* » fino a divenire, nelle colture a completo sviluppo, « *peach red* ». Altre tonalità di colore non sono state osservate. Non si notano particolarità degne di rilievo nell'odore delle colture.

PROPRIETA' TINTORIALI

Una spiccata difficoltà ad assumere colorazione con i consueti procedimenti è carattere costante delle cellule, sviluppate sia in substrato inorganico che organico. E' stata ripetutamente eseguita sempre con esito negativo la colorazione del Gram, sia nella sua formula originale che nelle formule modificate di Hucker e di Burke-Kopelov-Beerman.

Nella ricerca di un soddisfacente metodo di colorazione, numerosi sono stati i procedimenti seguiti, tra i quali quelli suggeriti da Winogradsky (1929) e dalla Krzemieniewska (1933) e adottati da Stanier (1942) nello studio del genere *Cytophaga* nonché quello seguito da Soriano (1947) pure per analoghi microorganismi ben noti per la loro scarsa affinità verso i comuni coloranti. Il metodo di Winogradsky basato sull'impiego dell'alcool etilico bollente quale fissativo e sulla colorazione con eritrosina fenicata e violetto di genziana ed il metodo di Soriano basato sull'impiego di una soluzione alcoolica di rosa Bengala, si sono dimostrati superiori agli altri nell'impartire a tutto il corpo cellulare una colorazione più intensa (in modo particolare il metodo di Winogradsky). La colorazione secondo Giemsa e quella di Loeffler (formula modificata) rendono più visibili le granulazioni interne della cellula; si ottengono così preparati, nei quali appaiono colorate, soltanto le granulazioni interne, quali sono quelle di *Corynebacterium* e di certi *Lactobacillus*.

Sono stati fatti numerosi tentativi per ottenere colorazioni cigliari soddisfacenti, adoperando cellule cresciute in substrato organico, previo addensamento in limitata porzione del liquido culturale delle forme mobili per effetto fototropico, e seguendo il metodo suggerito da Bailey e modificato da Fischer e Conn.

Con tali procedimenti non si sono ottenuti, in verità, buoni risultati ma tali tuttavia da far ritenere molto probabile la presenza di flagelli polari.

CARATTERI FISIOLGICI

Attività fotosintetizzante. Le numerose prove condotte allo scopo di porre in evidenza l'attività fotosintetizzante del ceppo batterico isolato non lasciano dubbi circa la più saliente caratteristica di tale forma batterica: non si è mai avuto sviluppo in assenza di energia luminosa.

Lo studio del comportamento di fronte all'ossigeno, la presenza del quale è fattore indispensabile per lo sviluppo all'oscuro delle specie batteriche fotosintetizzanti non strettamente anaerobiche (*Athiorhodaceae*), rivela però alcuni fatti degni di interesse, sul valore dei quali si riferirà in seguito. Impiegando substrato « Standard » senza solfuro di sodio, con aggiunta di variabili quantità di autolizzato « Normale » di lievito ed allestendo le colture in tubo verticale, si nota che, in condizioni ben s'intende di appropriata illuminazione, il comportamento di fronte all'ossigeno è grandemente influenzato dalla concentrazione in autolizzato di lievito del mezzo culturale.

Alle più basse concentrazioni (1-5 % di autolizzato) lo sviluppo si rende manifesto in una limitatissima porzione al fondo della coltura; lo strato dove si osserva sviluppo aumenta gradualmente di spessore (aumentano pure le dimensioni delle colonie) con l'aumentare della concentrazione in autolizzato; alle concentrazioni più elevate (20-30-50 %) si manifesta il fenomeno opposto, cioè lo sviluppo è limitato ad uno strato superficiale più o meno spesso, rimanendo gli strati più profondi privi completamente di sviluppo. Tale fatto è più evidente nelle colture in recipienti chiusi contenenti il medesimo substrato: se la concentrazione supera un certo limite (20-30 %), lo sviluppo manca completamente; in tali condizioni, il più rapido ed abbondante sviluppo si ottiene con la coltura in tubo aperto.

Tali fatti fecero ritenere possibile la coltura di questo solfobatterio in piena aerobicità (coltura a striscio) ed in assenza di luce, allorché nel substrato fossero presenti in misura sufficiente le sostanze organiche dell'autolizzato di lievito; tutti i tentativi fatti in tal senso sono però rimasti senza risultato.

pH ottimo. — L'esame di serie di colture in substrato inorganico al solfuro, portate a differenti valori di pH con acido fosforico od idrato sodico, permette di rilevare come, ai valori di pH variabili da 6 a 7,0 si abbia la massima rapidità di sviluppo; a valori di circa 7,2-7,5, lo sviluppo è estremamente lento od addirittura assente mentre si può ancora ottenere sviluppo a valori di 5,5 ed anche 5. Nelle colture organiche all'autolizzato di lievito si nota comportamento simile a quello indicato.

Ottimo di temperatura. — Numerose osservazioni dimostrano ottime le temperature comprese tra i 20° C ed i 23° C. Temperature di poco più elevate (25°-27° C) rallentano ed inibiscono completamente lo sviluppo.

Alimentazione azotata. — A 5 cc. di agar lavato al 4 %, contenuti in provette sterili, si sono aggiunti cc. 4 di un substrato reso sterile per filtrazione, della seguente composizione:

Na₂S.9H₂O g 2,5, NaHCO₃ g 10, K₂HPO₄ g 1, MgCl₂ g 0,5, FeSO₄ tracce, CaCl₂ tracce, acqua bidist. cc. 1000 (pH per acido fosf. 6,8).

Soluzioni sterili, alla concentrazione del 2%, di cloruro ammonico, nitrato di potassio, nitrito di potassio, asparagina ed urea (sterilizzata per filtrazione) sono quindi aggiunte sterilmente nelle proporzioni di 1 cc. per tubo in modo da ottenere una concentrazione finale di tali composti pari al 0,2 %. I tubi, muniti del tappo di chiusura di paraffina, sono al solito tenuti alla temperatura di 23° C in illuminazione.

Il cloruro ammonico, il nitrato potassico e l'urea si mostrano ugualmente utilizzati da parte del microorganismo; l'asparagina è molto meno utilizzata mentre il composto nitroso non solo non è utilizzato ma esercita netta azione tossica.

Fluidificazione della gelatina. — Una prolungata incubazione (2 mesi) di colture in tubo con substrato inorganico reso solido con gelatina non permette di osservare la minima attività fluidificante.

Utilizzazione composti inorganici dello zolfo. — Malgrado venga generalmente asserito che nel metabolismo fotosintetizzante dei solfobatteri il solfuro possa essere sostituito con altri composti dello zolfo tra i quali in primo luogo il tiosolfato, tutti i tentativi fatti per coltivare il microorganismo qui descritto in substrati contenenti tiosolfato in luogo del solfuro sodico hanno dato risultati completamente negativi. Dall'esito di ripetute prove colturali, eseguite in condizioni di pH, concentrazione ed anaerobicità variabili, si può affermare che, a differenza degli altri solfobatteri conosciuti, il tiosolfato non viene utilizzato nel processo di fotosintesi da parte del ceppo batterico isolato.

Le equazioni



riportate da van Niel (1931, pag. 86) quali espressioni del bilancio chimico del processo di fotosintesi, hanno suggerito l'opportunità di eseguire alcune analisi del liquido culturale inorganico contenente solfuro, dopo sviluppo anaerobico per un determinato periodo di tempo alla temperatura di 22°-23° C. La determinazione del contenuto del liquido in CO₂ è stata condotta per via gravimetrica previa aggiunta di HgCl₂ per trattenere H₂S, secondo il procedimento seguito da van Niel (1931).

La determinazione dei composti ridotti o parzialmente ridotti dello zolfo è stata compiuta seguendo il metodo di Kurtenacker (1924), metodo che permette la determinazione contemporanea dei solfuri, solfiti e tiosolfati per via iodometrica.

Tale metodo si è mostrato adatto specie nel caso di colture giovani, per le quali la semplice determinazione iodometrica non poteva dare sicurezza circa la natura del composto o dei composti riducenti. Si è constatato comunque, nel caso di substrati contenenti ancora solfuro, l'assenza di composti riducenti lo iodio diversi dal solfuro. La determinazione dei solfati è stata eseguita seguendo il metodo volumetrico formulato da Ollgaard (1934) e modificato da Raistrick (1948), basato sulla precipitazione dei solfati con benzidina e successiva titolazione con BaCl₂ in presenza di rodizonato di sodio quale indicatore, previo allontanamento dell'H₂S mediante ebollizione per 30' in presenza di HCl (1/32 N); si è determinato in tal modo lo zolfo presente come solfato inorganico ed evtl. etero (non si è comunque dimostrata la presenza di solfato in tale ultima combinazione). Si è tenuto conto ovviamente, nella valutazione dei dati analitici, del contenuto in solfato inorganico delle colture testimonio. Un esempio di analisi, eseguite su colture in mezzo inorganico ma dopo diversi periodi di incubazione, è riportato nella seguente tabella.

Prova	Età coltura in giorni	H ₂ S ossidato mg %	H ₂ SO ₄ prodotto mg %	Solfo elementare prodotto mg %	CO ₂ metabolizzata mg %	
					Valori teorici	Valori trovati
1	5	11,4	12,3	6,6	11 – 4,5	15,2
2	10	18,2	35,3	5,4	31,5 – 3,7	34,7
3	15	21,0	50,6	3,0	45,2 – 2,1	47,4

Le cifre riportate nella tabella e relative alla quantità teorica di CO₂ metabolizzata (ridotta) sono desunte: quelle della colonna a sinistra, dalla equazione (B) e quelle della colonna a destra dalla equazione (A) soprariportate.

Poichè l'analisi condotta secondo il metodo di Kurtenacker non ha indicato presenza di composti dello solfo riducenti lo iodio diversi dall'H₂S, le cifre riportate nella colonna relativa allo solfo elementare, ottenute per differenza tra solfo presente come H₂S e solfo presente come H₂SO₄ possono ritenersi esatte. E' interessante notare come lo solfo, separatosi in un primo tempo piuttosto abbondantemente in seno al liquido colturale, venga in seguito ulteriormente ossidato ad H₂SO₄ con contemporanea riduzione fotochimica dell'anidride carbonica. La notevole corrispondenza tra i valori teorici e quelli osservati relativi alla quantità di CO₂ organicata fornisce prova evidente della validità delle equazioni soprariportate.

Utilizzazione sostanze organiche. — Particolare attenzione è stata rivolta allo studio di tale attività fisiologica; la possibilità che taluni composti organici possano essere utilizzati nei processi di fotosintesi realizzati dai solfobatteri pigmentati precipuamente quali H-donatori, è un fatto che ha raccolto per opera di ricercatori quali van Niel, Müller, Foster e altri tale serie probante di dati sperimentali da non lasciare dubbi circa la sua validità generale. Non sembra esservi dubbio che anche la specie microbica descritta in questa nota sia capace di utilizzare sostanze organiche per il suo processo moltiplicativo e di questo è indice molto eloquente lo sviluppo notevolissimo che è possibile ottenere in substrati contenenti autolizzato di lievito, sviluppo incomparabilmente superiore a quello che si ottiene in substrati inorganici contenenti la medesima quantità di solfo. Talune prove preliminari condotte con substrato inorganico «Standard» agarizzato, senza solfuro, ma aggiunto di quantità variabili di acetato di sodio (0,1-0,2%) ed a pH variabile da 6 a 7,5, non diedero alcun risultato. Nella ipotesi che per la utilizzazione di composti organici da parte del microorganismo fosse indispensabile la presenza di fattori di crescita, al substrato impiegato per le prime prove colturali furono aggiunte quantità progressivamente crescenti di autolizzato di lievito «Normale», allestendo contemporaneamente una serie parallela di colture con le stesse quantità di autolizzato ma prive di

acetato di sodio. I risultati furono insospettati ma eloquenti: nei tubi senza acetato di sodio si cominciò a notare sviluppo nella parte profonda del tubo di coltura soltanto a concentrazioni di autolizzato pari al 2 % in volume ed oltre, mentre a più basse concentrazioni le colture rimasero completamente prive di sviluppo. Per una più esatta interpretazione di tale prova è utile tenere presente prove analoghe condotte da van Niel (1944) con un ceppo di *Rhodospirillum*. sp. ed un substrato liquido incubato in recipienti chiusi contenente dosi variabili di autolizzato e di acetato: una parte dell'autolizzato di lievito adoperato da van Niel, in base al suo contenuto in sostanza secca, equivale a circa 13 parti dell'autolizzato « Normale » adoperato nella presente prova. Il sopra citato autore trova che (pag. 42) con 1 cc. o più di autolizzato di lievito per litro, lo sviluppo è proporzionale alla quantità di acetato presente nel mezzo; la percentuale quindi del 0,1% di autolizzato di lievito, equivalente nel nostro caso ad una concentrazione circa dell'1 %, è sufficiente a che siano forniti al ceppo di *Rhodospirillum* i fattori di crescita verso i quali tale specie è incapace di sintesi. Nel caso presente, se l'ipotesi della necessità di fattori di crescita quali fattori indispensabili per lo sviluppo in acetato fosse stata esatta, si sarebbe dovuto osservare nella serie di colture con acetato ed autolizzato, sviluppo batterico non soltanto alla concentrazione sopra riportata del 2 % in autolizzato, ma anche a concentrazioni inferiori. Tale fatto però non solo non si è verificato ma sono pure risultate prive di sviluppo anche le colture all'acetato contenenti quantità più elevate di autolizzato di lievito (5-10 %). Due ipotesi sono state perciò formulate per rendere ragione del mancato sviluppo nelle condizioni accennate: l'acetato di sodio *a*) esercita, alla concentrazione impiegata del 0,2 %, azione tossica sullo sviluppo batterico oppure *b*) può essere assimilato soltanto in condizioni anaerobiche tali da non poter essere realizzate in colture agarizzate verticali sia pure protette da uno strato di paraffina. Ulteriori prove però, condotte con il medesimo substrato non agarizzato, contenuto in recipienti chiusi ed addizionato delle medesime variabili quantità di autolizzato ed acetato non lasciano dubbi circa la non utilizzazione di quest'ultimo da parte del microorganismo. La concentrazione del 0,2 % in acetato di sodio si è dimostrata leggermente tossica.

Numerosi altri composti organici sono stati quindi studiati mediante saggi di coltura con substrato liquido in recipiente chiuso, aggiungendoli in quantità variabili dal 0,1 al 0,3 % alla soluzione « Standard » inorganica priva di zolfo ma arricchita del 2 % di autolizzato *Normale* di lievito (quantità che da sola non permette che uno scarso sviluppo). L'aggiunta al substrato di piccole quantità di Na₂S (0,005%) si è dimostrata priva di influenza. Non si è mai ottenuto sviluppo superiore alle prove testimonio, mentre sempre sviluppo ottimo si è avuto nelle colture parallele con substrato inorganico al zolfo. Numerose indicazioni permettono di escludere che si sia operato a valori di pH non confacenti (6,5), poichè variazioni di pH non hanno portato a migliori risultati. Sono state saggiate le seguenti sostanze organiche: *glucosio*, *mannosio*, *frut-*

tosio, arabinosio, maltosio, mannite, sorbite, lattato di sodio, citrato di sodio, propionato di sodio e tartrato di sodio.

Nel tentativo di trovare un composto organico suscettibile di essere utilizzato da questa forma batterica sono stati pure saggiati numerosi aminoacidi e cioè: *beta-alanina, d1-alfa-alanina, l(-)leucina, d1-leucina, d1-metionina, l(+)-cisteina, acido glutammico, acido aspartico, l-tirosina, l-istidina*, aggiunti singolarmente al substrato consueto contenente il 2 % di autolizzato di lievito. Si sono ottenuti risultati completamente negativi eccezione fatta per la cisteina la quale ha permesso uno sviluppo che, se pure scarso, è risultato sempre superiore alle prove testimonio.

Malgrado i risultati negativi di tali prove è tuttavia da presumere che talune sostanze organiche siano utilizzate da questo microorganismo; il fatto che non sia stato possibile identificare tali sostanze tra quelle di norma utilizzate dalle forme batteriche (solfobatteri fotosintetizzanti) alle quali questa specie deve essere indubbiamente riferita, accentua la opportunità di più estese indagini sopra questo interessante aspetto della fisiologia della specie descritta.

CONCLUSIONI

I caratteri morfologici e fisiologici della specie descritta sono indubbiamente tali da permetterne il riferimento all'ordine *Eubacteriales*, sottordine *Rhodobacterineae* Breed, Murray e Hitchens, quali sono definiti nella ultima edizione (1948) del Bergery's Manual of Determinative Bacteriology. In tale sott'ordine sono comprese, come già si è riferito nella parte introcluttiva, le famiglie: *Thiorhodaceae*, *Athiorhodaceae* e *Chlorobacteriaceae*; il tipo di pigmentazione ne esclude l'appartenenza alla ultima famiglia; la mancanza completa di fattori di crescita organici nei substrati dove è possibile il normale sviluppo di questa specie batterica fanno anche escludere l'appartenenza alla famiglia delle *Athiorhodaceae* poichè nella chiave sistematica si afferma che le specie appartenenti ai generi di tale famiglia « *all require organic growth factor* ». Il riferimento alla prima famiglia, *Thiorhodaceae*, sembrerebbe quindi pienamente giustificato secondo la citata classificazione. Una attribuzione tassonomica però di tale natura suscita perplessità non indifferenti, connesse precipuamente con i caratteri morfologici della forma batterica qui descritta: un aspetto morfologico anche soltanto in qualche punto simile non è dato di rilevare infatti in alcuno dei generi descritti, nella citata classificazione, come appartenenti a tale famiglia. La istituzione di un nuovo genere, che sarebbe la conseguenza più logica di tale stato di cose è problema così delicato però, da far ritenere preferibile procedere ad un accurato confronto della specie descritta con le specie incluse in ambedue le famiglie *Athiorhodaceae* e *Thiorhodaceae* senza tener conto di quei loro caratteri distintivi cui le considerazioni che faranno seguito toglieranno molto del loro attuale valore tassonomico.

E' innegabile la spiccata somiglianza tra l'aspetto morfologico della presente forma batterica e quello delle specie del genere *Rhodopseudomonas* (*Athiorhodaceae*), in modo particolare la *R. palustris*; se non fosse infatti per la presenza, in questa specie, di strane forme ramificate, richiamanti a van Niel l'aspetto morfologico di *Corynebacterium* e *Mycobacterium*, dovremmo concludere per la perfetta identità morfologica. La presenza di quelle particolari granulazioni, sulle cui modalità di formazione ho riferito altrove nel testo, non sembrano importanti quale carattere distintivo, poichè, con tutta probabilità, formazioni analoghe sono presenti nelle forme già classificate, come induce a pensare l'aspetto delle riproduzioni fotografiche della *R. palustris* riportate da van Niel (1944, pag. 90, foto n. 23). Un esame accurato dovrebbe essere fatto a tale proposito, per vedere se esista qualche relazione tra le citate formazioni granulari e le ramificazioni osservate da van Niel nella *R. palustris*. E' interessante osservare come a tali granulazioni sembrino legati alcuni caratteri fisiologici della cellula tra i quali, ad esempio, la longevità: il trapasso infatti in nuovo substrato di coloni di una certa età (fino a 2 mesi), sviluppate in ambiente minerale e formate, al momento del trasferimento medesimo, di cellule contenenti le granulazioni descritte, non da mai luogo ad insuccesso, mentre ciò non accade nel caso di colonie costituite da cellule prive delle granulazioni in parola. L'assenza tra l'altro di quei particolari « *cocoid bodies* » riscontrati da van Niel nel suo ceppo n. 7 (1931) non permette un riavvicinamento morfologico a quest'ultimo, del resto simile per molti caratteri fisiologici e biochimici.

I caratteri morfologici delle specie appartenenti ai generi della famiglia *Thiorhodaceae* sono infine così nettamente diversi da quelli della specie descritta da non consentirne un ravvicinamento ad alcuno di tali generi.

Gli aspetti dello sviluppo della specie qui descritta nei substrati contenenti autolizzato di lievito, caratterizzati, sia dalla colorazione che dall'aspetto del sedimento (mai mucoso ma sempre sciolto e facilmente disperdibile alla agitazione) richiamano l'aspetto colturale della *R. palustris*, coltivata nelle stesse condizioni. La temperatura ottima di sviluppo è una delle caratteristiche fisiologiche che differenziano nettamente la specie descritta da quelle della famiglia *Athiorhodaceae*, le quali mostrano, tutte indistintamente, di possedere un ottimo di temperatura notevolmente più elevato (ottimi inferiori a 30°C costituiscono una eccezione!); tali elevate temperature non permettono, al contrario, alcuno sviluppo della specie descritta, sviluppandosi questa ottimamente intorno ai 20°-22°C, mentre temperature di 25°-26°C ne inibiscono completamente lo sviluppo. A tale riguardo più simile appare il comportamento del ceppo n. 7, già ricordato, per il quale l'ottimo di temperatura sembra essere intorno ai 25°C e quello delle specie (*Chromatium* etc.) della famiglia *Thiorhodaceae*.

Il comportamento di fronte all'ossigeno, che, nelle *Athiorhodaceae*, sembra, almeno per ciò che riguarda alcune specie, facilmente modificabile per adattamento, appare qui carattere molto stabile: a parte infatti ciò che è stato osservato a proposito dello sviluppo in substrati ad ele-

vato contenuto in autolizzato di lievito, non si è osservato alcun apprezzabile mutamento nel grado di anaerobicità di tale forma batterica.

La mancata fluidificazione della gelatina è carattere comune all'intero gruppo, eccezion fatta per la *R. gelatinosa*.

Il carattere biochimico indubbiamente più saliente della nuova specie batterica è dato dalla sua facoltà di sviluppo in substrati contenenti solfuro, in assenza di qualsiasi fattore di crescita; si comporta cioè come autotrofa nel senso più ortodosso della parola.

Tale carattere biochimico avvicina fortemente la specie qui descritta, oltre che alle specie della famiglia *Thiorhodaceae*, al ceppo n.7 di vanNiel che pure mostra di essere capace di sviluppo assolutamente autotrofo. Le pur non abbondanti informazioni che intorno a tale ceppo van Niel riporta (1931), permettono però una sicura separazione della specie qui descritta non soltanto su basi morfologiche, che si traducono, già si è visto, in differenze sostanziali, ma anche, in parte, fisiologiche. Carattere peculiare di questa nuova specie è, infatti, rappresentato dalla possibilità, che essa possiede, di sviluppare in substrato inorganico contenente solfuro anche in elevate concentrazioni (0,2%) al pH però inconsueto di 6 ed anche meno e di essere frenata nello sviluppo da valori di pH leggermente superiori a 7. Il ceppo n. 7 invece « *as some other strains behaving quite similarly need a strongly alkaline medium: below a pH of 8,4 they do not develop at all* ». Un così dissimile comportamento fisiologico tra questa specie ed il ceppo n. 7, ed a questo possiamo aggiungere tutti i ceppi di solfo batteri isolati e studiati da van Niel, sembra essere espressione, secondo considerazioni espresse da van Niel stesso, di una straordinariamente elevata resistenza all'azione tossica esercitata dalle molecole di H₂S indissociate, la cui concentrazione è di gran lunga più elevata, a tali valori del pH, rispetto alla concentrazione delle molecole dissociate in HS' e S". Curioso è il fatto che un comportamento analogo è manifestato da taluni solfobatteri verdi (ceppi n. 5, 15 e altri di van Niel, 1931), dei quali era, del resto, nota la notevole resistenza alle alte concentrazioni di H₂S nel loro ambiente naturale.

Altro particolare degno di nota è l'accertata insostituibilità del solfuro con altri composti ridotti dello solfo, primo tra i quali, il tiosolfato. Tale caratteristica richiama il microorganismo descritto da Nadson (1912), ora compreso, con la denominazione di *Chlorobium limicola* Nadson, nelle *Chlorobacteriaceae*, capace di utilizzare, secondo questo A., soltanto il solfuro quale H-donatore nel processo di fotosintesi. Tale proprietà biochimica sembra essere in contrasto con quanto è affermato da van Niel circa la possibilità da parte dei solfobatteri strettamente autotrofi (*Thiorhodaceae*) di utilizzare indifferentemente solfuri, solfiti, solfo e tiosolfati: « *the experiments show... the possibility of substituting sulphur, sulphite and thiosulphate for the H₂S and may be considered as an experimental support for the stepwise dehydrogenation of H₂S to H₂SO₄* » (van Niel, 1931, pag. 98). Che nelle prove colturali, delle quali si è riferito altrove nel testo, si siano realizzate quelle condizioni di anaerobicità, che van Niel indica come essenziali per una utilizzazione

del tiosolfato, è fuori di dubbio, poichè, anche in presenza di tracce di H_2S , la specie qui descritta non ha mostrato alcuna facoltà di sviluppo a spese del tiosolfato aggiunto. Un attento esame però di quanto l'A. citato riporta circa la utilizzazione dei composti dello zolfo da parte delle varie specie di *Rhodospseudomonas* e *Rhodospirillum* (Athiorhodaceae), rivela come la possibilità di una attività deidrogenante (fotosintetizzante) di uno dei composti dello zolfo soprariportati, possa non essere accompagnata da analoghe attività nei riguardi di altri composti dello zolfo stesso. Mentre infatti quanto afferma van Niel (1944, pag. 45), essere le specie della famiglia Athiorhodaceae capaci di utilizzare per il loro sviluppo solfuri, tiosolfati e idrogeno molecolare, fa pensare che tale facoltà debba essere largamente diffusa in tale famiglia microbica, si vede poi come la possibilità di crescere in substrati contenenti tiosolfato, oltre ben s'intende ad una appropriata fonte di fattori di crescita, sia caratteristica di una soltanto delle specie descritte cioè della *R. palustris*, mentre, non essendo fatto alcun specifico accenno alla utilizzazione dell' H_2S , è dato concludere che tutte le specie descritte siano capaci di utilizzare questo composto per il processo di fotosintesi!

Si deve accennare da ultimo al comportamento della specie microbica qui descritta di fronte alle sostanze organiche: è presumibile che questa specie utilizzi, al pari delle altre, per il processo di fotosintesi, sostanze organiche, ma quali esse siano e quali le modalità della loro utilizzazione, non è ancora noto, essendo fallite tutte le prove sperimentali fatte a tal fine. Questa circostanza, che non influisce sulla definizione tassonomica della specie, lascia aperto un largo e interessante campo di ricerca.

Si può affermare, in conclusione, che tutti i caratteri morfologici posseduti dalla specie descritta ed anche gran parte di quelli fisiologici ne giustificherebbero la inclusione nella famiglia delle *Athiorhodaceae* con la istituzione di una nuova specie nel genere *Rhodospseudomonas*. La specie ha però la facoltà di sviluppare in assenza di fattori di crescita onde, per tale carattere, dovrebbe trovare posto nella famiglia delle *Thiorhodaceae*, di cui nessun genere però ha caratteristiche morfologiche simili a quelle possedute dalla specie stessa.

Da quanto si è riferito nella parte introduttiva della presente nota circa il valore sistematico che taluni studiosi moderni sono inclini ad attribuire al carattere *autotrofia*, ci sembra opportuno abbandonare tale carattere quale *unico* elemento di distinzione delle due sopracitate famiglie; separare infatti, *in famiglie diverse*, le forme morfologicamente e fisiologicamente identiche solo perchè differenti sono le loro capacità sintetizzanti nei confronti dei fattori di crescita, costituisce un artificio sistematico pericoloso ed ingiustificato, perchè dovrebbero allora separarsi in distinte famiglie anche le forme che posseggono o meno capacità di sintesi nei confronti, ad esempio, di certi polisaccaridi.

Quand'anche si voglia, per ora, mantenere le specie batteriche pigmentate fotosintetizzanti separate dalle corrispondenti specie non fotosintetizzanti comprese nelle *Eubacterineae*, la fusione delle due famiglie *Thiorhodaceae* e *Athiorhodaceae* in una unica entità sistematica appare



Fig. 1

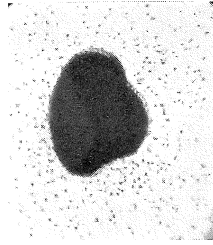


Fig. 2

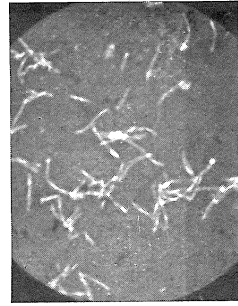


Fig. 3

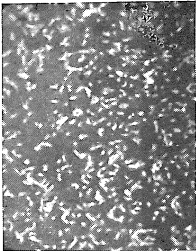


Fig. 4



Fig. 5

Microfoto n. 4 - da coltura in recipiente chiuso e con substrato contenente autolizzato di lievito 10% - giorni 5 - ingr. x 800. Preparato alla nigrosina.

Microfoto n. 5 - da coltura in tubo verticale e in substrato inorganico al solfuro agarizzato (giorni 2) - ingr. x 800. Preparato alla nigrosina.

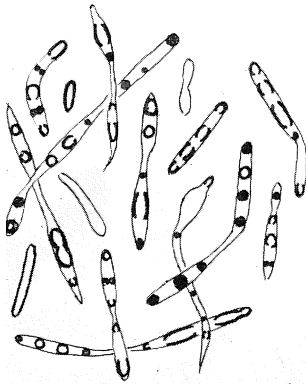


Fig. 6

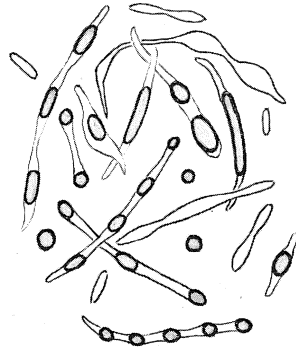


Fig. 7

Microfoto n. 1 - da coltura in recipiente chiuso ed in substrato inorganico al solfuro a pH 6,5 (giorni 6) - ingr. x 800. Preparato alla nigrosina.

Microfoto n. 2 - colonia da coltura in tubo verticale in substrato inorganico al solfuro agarizzato.

Microfoto n. 3 - da coltura in tubo verticale in substrato inorganico al solfuro agarizzato (giorni 6) ingr. x 800. Preparato alla nigrosina.

Figura n. 6 - disegno schematico di cellule cresciute in substrato inorganico al solfuro (giorni 4) osservate in campo oscuro.

Figura n. 7 - disegno schematico di cellule cresciute in substrato inorganico al solfuro (ore 24) contenenti granulazioni solforose

tanto più opportuna ora che la nuova specie viene a dare la dimostrazione dell'esistenza di forme intermedie che altrimenti non troverebbero collocazione in nessuna delle due famiglie pur possedendo caratteri dell'una e dell'altra. Il particolare tipo di pigmentazione potrebbe rappresentare carattere distintivo del nuovo raggruppamento al fine di permettere la separazione dalla famiglia delle *Chlorobacteriaceae*.

La famiglia *Rhodobacteriaceae* di Migula potrebbe essere ricostituita su nuove basi e includere i generi di entrambi le famiglie *Thiorhodaceae* e *Athiorhodaceae*, onde le specie batteriche dotate di metabolismo fotosintetizzante non siano più separate nè in base al criterio della presenza o meno dello zolfo nell'interno della cellula nè in base a quello della loro più o meno stretta autotrofia.

La definizione del genere *Rhodopseudomonas* risulterebbe così emendata da far posto anche alle forme che, per la loro autotrofia verso i fattori di crescita, ne erano escluse.

Alla specie descritta si propone il nome di *Rhodopseudomonas vannielii* n. sp., essendo giusto dedicarla all'autore (C. B. van Niel) che prevede l'esistenza di forme batteriche con metabolismo intermedio quale è quello della nuova specie.

RIASSUNTO

E' descritta una nuova specie di solfobatterio fotosintetizzante, *Rhodopseudomonas vannielii* n. sp., le cui principali caratteristiche sono così brevemente riassumibili:

Morfologia e caratteri colturali. — Colonie in substrato inorganico contenenti solfuro di sodio ed a pH 6,5 di colore giallo-verdastro o rosso-violetto, circondate, specie quelle sviluppate in più stretta anaerobiosi, da alone di solfo precipitato.

Cellule in substrato organico a base di autolizzato di lievito molto piccole (massimo 1,5 μ per 0,5 μ) gram-negative, sempre diritte, isolate, mai ramificate, attivamente mobili, molto probabilmente per mezzo di flagello polare; tendenza alla comparsa di cellule più allungate nelle colture più vecchie. Deposito mai mucoso ma sempre sciolto e facilmente disperdibile all'agitazione. Nessun odore particolare. Il liquido colturale è colorato in rosa dopo la deposizione delle cellule. Colore della coltura: da *shell pink* all'inizio a *peach red* nelle colture a sviluppo completo. In substrato inorganico contenente solfuro di sodio le cellule sono molto più allungate (14-16 μ) e più spesso regolarmente appuntite all'estremità, isolate, mai ramificate, gram-negative, immobili. Solfio contenuto sotto forma di inclusioni soltanto nelle cellule giovanissime. Assenti forme globose.

Caratteri fisiologici. — Preferisce valori di pH inferiori a 7; nei substrati inorganici vegeta ottimamente a pH 6,5 ma può ancora svilupparsi a pH 5,5; non sviluppa a pH 7,2-7,5 nelle medesime condi-

zioni. Ottimo di temperatura 22°-23° C; temperature di 25°-27° frenano ed arrestano lo sviluppo. Comportamento di fronte all'ossigeno fortemente influenzato dalla composizione del mezzo; non coltivabile in piena aerobiosi (colture in striscio). La gelatina non è fluidificata.

Caratteri biochimici. — Specie strettamente autotrofa potendo svilupparsi in assenza di sostanze organiche e di fattori di crescita. Tra i composti inorganici dello zolfo soltanto i solfuri sono utilizzati per il processo di fotosintesi. Nessuna delle numerose sostanze organiche studiate (zuccheri, acidi, alcoli ed aminoacidi) si dimostra utilizzabile da questa specie; lo sviluppo in substrati organici contenenti autolizzati di lievito è comunque dovuto alla facoltà che questa specie possiede di utilizzare sostanze organiche per ora non identificate. Il riconoscimento di questa nuova specie offre motivo di proporre taluni emendamenti alla attuale classificazione dei solfobatteri pigmentati fotosintetizzanti: raggruppare le famiglie *Thiorhodaceae* e *Athiorhodaceae* nell'unica famiglia delle *Rhodobacteriaceae* e mantenere distinta da questa la famiglia delle *Chlorobacteriaceae*. Pertanto, non riconoscendo valida la separazione dei generi comprendenti specie strettamente autotrofe, queste entreranno a far parte dei generi rispettivi in base ai loro caratteri morfologici.

SUMMARY

A new species of photosynthetic sulphur-bacterium is described; main characteristics may be summarized as follows:

Cultural and morphological characters. — Colonies in sulphide-medium at pH 6,5 yellow-greenish to red-violet, surrounded, especially those in the anaerobic layers of the solid medium, by precipitated sulphur. Cells in yeast-autolysate-containing media very short (1,5 by 0,5 μ maximum), gram-negative, always straight, isolated, never suggesting branching, actively motile probably by means of polar flagella; tendency to long forms in old cultures. Growth never mucoid and deposit readily redispersible. Odor absent. Color from shell pink to peach red according to the age of culture. Cells grown in inorganic media are much more longer (14-16 μ and more) often possessing ends so regularly pointed as to suggest Cytophaga cells; non-motile, gram-negative, sulphur containing only in the very first stage of development. Globular forms absent.

Physiological characters. — pH values shifted consistently toward acidic range are generally preferred; optimum pH in inorganic sulphur containing substrates 6,5; may grow also at 5,5; pH values as high as 7,2-7,5 are unsuitable for growth in the same conditions. Optimum temperature 22°-23° C; at 25°-27° C growth very slow or absent. Behaviour toward oxygen greatly influenced by medium composition; no growth in full air (slant cultures). Gelatine not liquified.

Biochemical characters. — Strictly autotroph species, being able to develop in media organic substances and growth factors free. Sulphides only may support growth in inorganic media. None of the several organic

substances tested (sugars, acids, alcohols and aminoacids) appears to be utilized as substrate for photosynthetic metabolism; there is no doubt however as to the utilisation of so far unknown organic substances of yeast autolysate.

The discovery of this new species is said to render provisional character of the systematic of photosynthetic bacteria more felt than before. Need for growth factor being an indefensible criterion for segregation between *Thiorhodaceae* and *Athiorhodaceae* families, it's suggested to merge the two families into a new systematic unit for what is tentatively proposed family designation of *Rhodobacteriaceae* Migula differing from *Chlorobacteriaceae* in respect to pigmentation. The new species, named *Rhodopseudomonas vannielii* n. sp., is so included, on account of his morphological characters, in *Rhodopseudomonas* genus so emended as to comprehend strictly autotroph species also.

LETTERATURA

- Bailey H. D.: « Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. », 27, 111, 1929.
Bavendamm W.: « Die farblosen und roten Schwefelbakterien », Jena, 1924.
Bernhauer K.: « Gärungschemisches Praktikum », Berlino, 1935.
Buchanan R. E.: « J. Bact », 2, 155, 1917.
Buder J.: « Jahrb. wiss. Botan. », 58, 525, 1919.
Burke V.: « J. Bact. », 7, 159, 1922.
Czurda V. e E. Maresch: « Archiv Mikrobiol. », 8, 99, 1937.
Fischer P. J. e J. E. Conn: « Stain Tech. », 17, 117, 1942.
Foster J. W.: « Gen. Physiol. », 24, 123, 1940.
Gest H. e M. D. Kamen: « J. Biol. Chem. », 176, 299, 1948.
Gest H. e M. D. Kamen: « J. Bact », 58, 239, 1949.
Gest H. e M. D. Kamen: « Science », 109, 558, 1949.
Hucker G. J. e H. J. Conn: « N. Y. Agr. Exp. Sta », Tech. Bul., 128, 1927.
Hutner S. H.: « Arch. Biochem. », 3, 439, 1944.
Huther S. H.: « J. Bact », 52, 213, 1946.
Kluyver A. J. e H. J. L. Donker: « Chem. d. Zelle u. Gew. », 13, 134, 1926.
Kluyver A. J.: ke C. B. van Niel: « Zentr. f. Bakt. », II Abt., 94, 369, 1936.
Krzemieniewska H.: « Arch. Mikrobiol. », 4, 394, 1933.
Kurtenacker, A. e K. Bittner: « Ztschr. f. Anorg. Chem. », 141, 297, 1924.
Migula W.: « System der Bakterien », II Bd., Spezielle Systematik der Bakterien. Fischer, Jena, 1900.
Miyoshi M.: « J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo », 10, 143, 1897.
Molisch H.: « Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen », Fischer, Jena, 1907.
Muller F. M.: « Arch. Mikrobiol », 4, 131, 1933.
Nadson: « Bull. Jard. Imper. Botan. St. Pétersb. », 12, 64, 1912.
Nakamura H.: « Acta Phytochim », 9, 231, 1937; ibidem, 10, 211, 1937.

- Niel van C. B.: « Arch. Mikrobiol. », 3, 1, 1931.
- Niel van C. B.: « Bact. Rev. », 8, 1, 1944.
- Ollgaard E.: « Bioch. Ztsch. », 274, 181, 1934.
- Pribram E.: « J. Bact », 18, 361, 1929.
- Pribram E.: « Klassifikation der Schizomyceten », Leipzig, 1933
- Pringsheim E. G.: « Lotos », 71, 357, 1923.
- Pringsheim E. G.: « Bact. Rev. », 13, 47, 1949.
- Raistrick H. e J. M. Vincent: « Biochem. I. », 43, 90, 1948.
- Ridgway R. e all.: « Color Standards and Color Nomenclature », Washington, 1912.
- Roelofsen P. A.: « On photosynthesis of the Thiorhodaceae », Dissertation, Utrecht, 1935.
- Scardovi V.: « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 22, 293, 1946; ibidem, 24, 318, 1948.
- Soriano S.: « Antonie van Leeuw », 12, 215, 1947.
- Stanier R. Y. e C. B. van Niel: « J. Bact. », 42, 437, 1941.
- Stanier R. Y.: « Bact. Rev. », 6, 143, 1942.
- Winogradsky S.: « Bot. Ztg. », 45, 489, 1887.
- Winogradsky S.: « Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien »,
Heft I, « Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien », Leipzig,
1888.
- Winogradsky S.: « Ann. Inst. Past. », 3, 49, 1889.

Pervenuto in redazione il 1 maggio 1950.

Nuove forme di *Eutorulopsis dubia*

Cif. et Red.

NOTA II

ELISA CORBERI - assistente

Da uno stipte di *Torula rosea* proveniente dalla collezione del professor D. Carbone e classificato come *Eutorulopsis dubia* da Ciferri e Redaelli, e più tardi come *Rhodotorula mucilaginosa* var. *sanguinea* (Schimon) dalla J. Lodder, previo isolamento monocitogenetico, furono isolati stipti morfologicamente un poco diversi dall'originale, in maniera piuttosto semplice. Erano stati seminati alcuni palloni di brodo malto con lo stipte sopra ricordato, per controllare una sua eventuale variabilità naturale nei confronti di quella dovuta a potenti mezzi fisici, quali i raggi X. Ci interessava approfondire questo punto perchè in una precedente esperienza in cui la *Torula rosea* era stata irradiata con i raggi X, si erano ottenuti ceppi varianti in modo piuttosto notevole e per la forma e per il pigmento. I controlli (piastre di agar malto) provenivano tutti da culture a loro volta tenute su agar malto come pure le piastre che erano state irradiate; in quelle condizioni non si era trovata nessuna colonia in cui i caratteri fossero diversi da quelli dello stipte originario. Nella attuale esperienza il ceppo originario (fig. 1) venne tenuto in terreno liquido (brodo malto) in palloni della capacità di 300 cc. e da questi, rimasti a 30° per 3-4 giorni, poi all'ambiente, si allestirono a distanza di diverso tempo (4-8-39-46 giorni) piastre per diffusione con agar malto. Le piastre, tenute per 3-4 giorni a 30° poi all'ambiente ed alla luce, venivano esaminate dopo circa 15 giorni. Si ebbe così il modo di osservare che il colore della patina di pochissime colonie, non era uguale a quello della grande maggioranza: cioè era o lievemente più pallido, pur mantenendo la colonia la normale pastosità e lucentezza oppure più cupo, o perlomeno apparentemente tale, perchè la patina, perduta la normale consistenza mucilaginosa, era divenuta opaca. Così su un totale di 1694 colonie (complessivamente sommando tutte quelle che si ottennero nelle numerose piastre allestite) se ne osservarono 48 un poco diverse come aspetto (2,83 %). Queste si esaminarono tutte al microscopio e perchè inoltre non ci sfuggisse una eventuale alterazione delle cellule nelle colonie apparentemente normali se ne osservarono al microscopio 780 di queste.

Il risultato fu che non tutte le 48 colonie diverse per il colore risultarono tali anche per la forma delle cellule, cioè la maggioranza era formata da individui per lo più normali e con solo un piccolo numero di altri distintamente o più tondi o più allungati o più grossi o con un piccolo sottile prolungamento, quasi un tubetto germinativo. Solo 5 colonie mostravano una notevole uniformità nelle cellule, quasi tutte provviste del sottile prolungamento e di queste, 4 si isolarono. Cioè solo 5 delle 48 colonie erano in cultura pura, le altre erano un miscuglio tra il ceppo originario e quelli evidentemente di nuova formazione. Le 780 colonie apparentemente normali come aspetto, al microscopio risultarono quasi tutte costituite di cellule normali e solamente pochissime (circa l'1%) contenevano un numero molto basso di individui chiaramente o più grossi o più allungati o provvisti dei sottili prolungamenti. Sembra quindi che dove si nota un cambiamento macroscopico nella colonia (forma, colore, lucentezza anormali) si presentino pure alterazioni morfologiche e dove l'aspetto è normale vi sia solo una piccolissima probabilità che sia presente qualche forma insolita.

Con un lavoro successivo di piastre si riuscì ad avere in cultura pura: *a)* un ceppo in cui la cellula presenta dei sottili prolungamenti, quasi dei tubetti germinativi (vedi fig. 2 e 3); *b)* un ceppo di forma e pigmento normali ma in cui le cellule hanno tendenza a rimanere attaccate alla cellula madre (fig. 4); *c)* un ceppo di forma e pigmento normali ma notevolmente più grosso dell'originario (fig. 5); *d)* un ceppo pigmentato normalmente ma di forma prevalentemente allungata (fig. 6); *e)* un ceppo più piccolo e meno pigmentato dell'originario (fig. 7).

Non ci sembrò qui il caso di dare importanza alle percentuali delle colonie diverse dalla originaria poichè non è praticamente possibile scervere tra i ceppi fondamentalmente trovati uguali, quanti siano di vera nuova formazione e quanti abbiano viceversa una origine comune, cioè siano figli di una stessa cellula variante. Poichè sembra logico pensare che una volta formatasi la cellula variante, cominci subito a moltiplicarsi in seno al liquido dove è nata dando luogo ad una discendenza uguale a sè stessa più o meno numerosa. Si correrebbe quindi il rischio di contare come altrettanti ceppi varianti, quelli che potrebbero invece essere solo la discendenza di un'unica cellula variante. Per cui più che insistere nella ricerca delle percentuali, ci sembrò valesse la pena di approfondire le osservazioni sui ceppi varianti isolati. Essi, derivanti tutti da uno stipe unico, di forma lievemente ovale, che aveva subito in tempi successivi due isolamenti monocitogenetici ed era indubbiamente puro, ci fanno intravedere la possibilità che i diversi caratteri (forma, pigmento, disposizione delle cellule, ecc.) possano mutare piuttosto profondamente ed indipendentemente. Dopo isolamenti di piastra in piastra e dopo parecchi trapianti eseguiti per assicurarci della stabilità dei nuovi caratteri, i ceppi si saggiarono nei riguardi della formazione delle colonie giganti, del potere fermentativo, della fluidificazione della gelatina.

Essi mostrarono rispetto al ceppo originario differenze poco notevoli. Si seguirono inoltre al microscopio per vedere il loro comportamento nel tempo. Per la maggioranza di essi è in tutto simile a quello del ceppo originario; uno solo se ne discosta notevolmente ed è quello dotato del

TAVOLA I

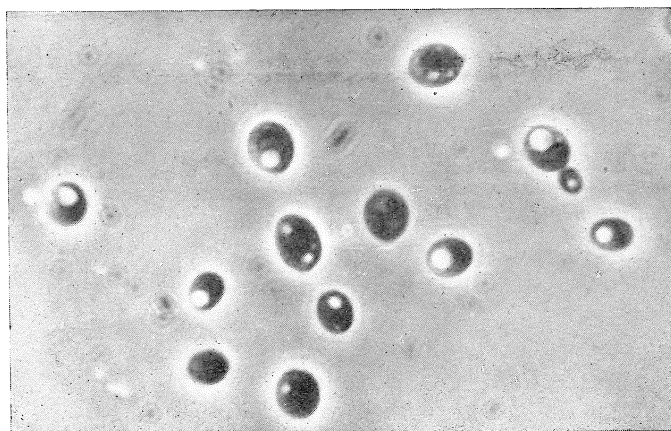


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

Microfotografie a contrasto di fase - ingr. $\times 2.200$

TAVOLA II

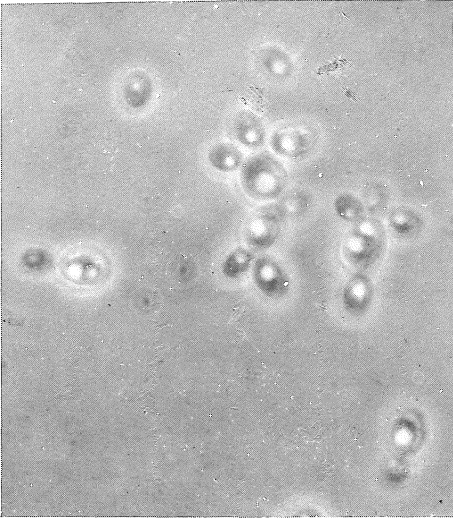


Fig. 4

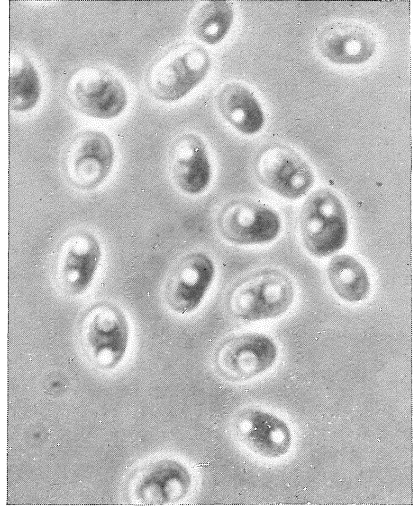


Fig. 6

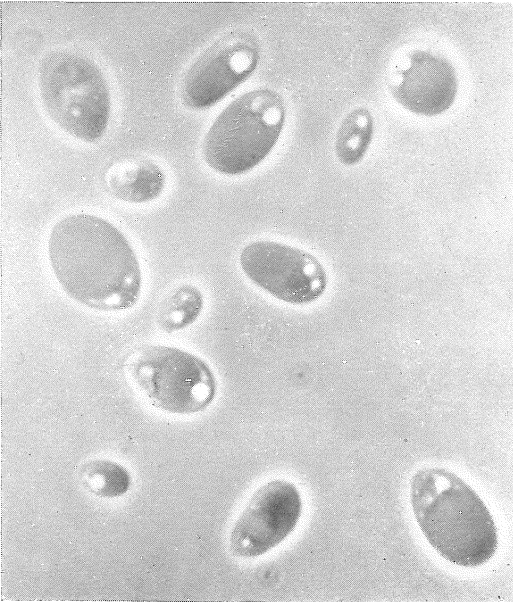


Fig. 5



Fig. 7

Microfotografie a contrasto di fase - ingr. $\times 2.200$

prolungamento. Ne riassumiamo brevemente le particolari caratteristiche: si moltiplica da principio per gemmazione tanto che dopo 24-48 ore sia in brodo che in agar malto, la cultura difficilmente potrebbe essere distinta da quella originaria; dopo qualche giorno (circa 4-8) cominciano a comparire sia forme più grosse e tonde quasi sferiche in cui le granulazioni ed i corpuscoli oleosi si sono fatti aderenti alla membrana e di cui qualcuna emette un piccolo sottile prolungamento a forma di tubicino, sia inoltre piccoli sottili prolungamenti anche su cellule apparentemente normali come forma; raramente qualche cellula ne ha due e pure molto raramente si vede un piccolo ingrossamento tondeggianti all'estremità del tubicino stesso; quando le culture invecchiano (3-4 mesi di età) si osservano molte di queste forme quasi rotte o spezzate.

Contemporaneamente a queste forme se ne vedono sempre anche di normali. L'emissione dei sottili prolungamenti pare sia favorita da condizioni di carenza alimentare: infatti coltivando questo lievito in piastre di agar malto in alto ed in basso strato, i prolungamenti compaiono molto più presto e molto più numerosi in questo secondo caso, soprattutto se le colonie sono fitte. Il colore delle colonie è molto vicino a quello delle colonie dello stipite originario, ne differisce solo un poco perchè la patina non è lucida e mucosa ma piuttosto opaca; invecchiando diviene leggermente più chiara soprattutto quando si sono formati molti prolungamenti. Queste forme un poco differenziate non sono conosciute come produzioni comuni della *Torula rosea*. Infatti, esse non si trovano nè nella descrizione particolareggiata che fanno Ciferri e Redaelli proprio di questo stesso ceppo nella loro monografia sulle *Torulopsidaceae* a pigmento rosso del 1927, nè le vide la Lodder che nel 1934 esaminò a sua volta il medesimo stipite. Non vi è cenno alcuno alla possibilità di trovare forme di tal genere nella descrizione dei caratteri peculiari nè della sottofamiglia delle *Rhodotorulaceae*, nè del genere *Rhodotorula*, cui appartiene il nostro stipite originario. Dobbiamo tuttavia riconoscere che la variabilità della forma da tonda ad allungata è ammessa piuttosto largamente, infatti la Lodder parla per questo ceppo di forme ovali delle dimensioni di $(2,8-4) \times (4,5-6) \mu$ e di forme lunghe ovali $(2,8-3,5) \times 10 \mu$. Le misure corrispondono a quelle dei nostri ceppi salvo che noi ora abbiamo degli stipiti in cui prevalgono a gran maggioranza e di volta in volta le diverse misure. Cercando nella letteratura a quali forme già conosciute poteva essere avvicinato il lievito coi prolungamenti ci imbattemmo in un lavoro di H. Will del 1912 in cui è descritta una forma che un poco ricorda la nostra. La sua è però più differenziata: presenta infatti prolungamenti o tubetti germinativi con un ingrossamento reniforme all'estremità che si stacca e cade. Will la colloca tra i *Blastoderma* (secondo gruppo delle *Torulaceae*) perchè gli ricorda molto il *Blastoderma salmonicolor* di Fischer e Bredeck. Inoltre A. J. Kluyver e C. B. Van Niel nel 1924 in alcuni lieviti osservano prolungamenti e cellule reniformi che considerano come conidi e creano il genere *Sporobolomyces*. Ciferri e Redaelli nel 1927, accolgono questo genere nella sottofamiglia delle *Mycotoruleae*. Nel 1934 Lodder lo toglie dai lieviti asporigeni per collocarlo tra quelli sporigeni, giudicando le formazioni reniformi qualcosa di molto simile a basidiospore. I nostri ceppi non presentano una diffe-

rennazione così chiara come i ceppi sopra ricordati; essi non possiedono cellule che abbiano nettamente l'aspetto di formazioni sporali; per lo meno per ora non ne sono state osservate a meno di non considerare tali le cellule tonde; ed i prolungamenti come tentativi di formazione di micelio.

I ceppi sono ancora in studio, quindi non è possibile dire nulla di definitivo, però pur essendo di struttura più semplice di quelli di Will e di Kluyver e Van Niel si avvicinano a questi. Ma è possibile che da una forma così semplice come la nostra originaria si giunga ad una discretamente differenziata ed attraverso a quale meccanismo? E' da ricordare che i nuovi ceppi derivano tutti da un'unica cellula lievemente ovale per due volte di seguito isolata in cultura monocitogenetica e se per la formazione dei ceppi varianti di poco, cioè con cellule, o più tonde o più grosse o più allungate, si può invocare la selezione, non sembra altrettanto facile per la formazione di quelli con i prolungamenti perché si passerebbe da una specie asporigena ad una in cui invece si parla di forme che molto si avvicinano alle spore. E' molto logico, nel caso nostro, il sospetto che si tratti di un banale inquinamento, ma sia per la modalità dell'esecuzione, sia perché il medesimo risultato si è ottenuto costantemente e partendo da parecchie colonie risolte dallo stipite originario (5) non è affatto azzardato escluderlo. Ci sembra di particolare interesse far notare la non comune coincidenza per cui i ceppi che più ricordano i nostri con prolungamento, cioè quelli di Will e di Kluyver e Van Niel sono stati isolati proprio da culture di altri lieviti e giudicati come inquinamenti di questi. Il ceppo del primo autore sarebbe stato un inquinamento di un *Mycoderma humuli* (*Mycoderma* genere della sottofamiglia delle *Torulopsidae*), quelli dei secondi di una *Torula flavescens* e di una *Torula alba* di Saito (*Torulopsis flavescens* (Saito) Lodder, e *Torulopsis albida* (Saito) Lodder, secondo Lodder). Questi autori osservarono che in culture piuttosto vecchie di lieviti, appartenenti precisamente alle *Torulaceae*, ad un certo punto oltre al ceppo normale vi erano anche altre forme di lieviti, che isolate considerarono come inquinamenti.

Interpretare come inquinamenti anche il nostro caso, non sembra giustificabile ed è ammissibile possa venirci il dubbio che anche in quei casi sopra ricordati, si potesse trattare di un fatto normale, cioè della produzione, se pure rara, di ceppi nuovi (mutazioni), oppure di fasi di un ciclo di vita che ci sfugge nel suo complesso. Nel tentativo di appurare con i pochi mezzi a disposizione e considerando come nei vecchi controlli provenienti tutti da agar malto (esperienza coi raggi X) non si era notata mai nessuna colonia variante e che viceversa ora erano state notate partendo da un terreno non più solido ma liquido, si pensò di seminare lo stipite originario di *Torula rosea* contemporaneamente in brodo ed in agar malto (il brodo in palloni da 300 cc. e l'agar inclinato in grossi provettoni) per vedere come erano le colonie che ne derivavano. Sia l'agar che il brodo, preparati contemporaneamente e con il medesimo malto, una volta seminati si tennero nelle stesse precise condizioni a 30° per 3 o 4 giorni, poi all'ambiente. Dopo 53 giorni si allestirono piastre per diffusione, sia prelevando dall'agar che dal brodo. Le piastre si osserva-

Rono circa una quindicina di giorni dopo il loro allestimento. L'esperienza si ripeté con 4 stipti normali, provenienti *dalla Torula rosea* monocitogenetica. Ecco il risultato complessivo:

<i>colonie provenienti dal brodo malto:</i>			
Totale delle colonie osservate	Numero delle colonie d'aspetto normale	Numero delle colonie d'aspetto diverso	% colonie diverse
8001	7991	100	1,25
<i>colonie provenienti dall'agar malto:</i>			
5602	5601	1	0,017

Si osservarono al microscopio tutte le colonie un pò diverse dal normale e delle rimanenti solo qualcuna.

Le varianti (o più chiare o più scure o più opache) risultarono come al solito miste di cellule del tipo normale e dei tipi o più grossi o più allungati o coi sottili prolungamenti. Il risultato conferma quanto si era già osservato: dall'agar più scarsa probabilità di ottenere una variazione dei caratteri normali che non dal brodo. Si direbbe quindi che la possibilità di una variazione anche notevole sia insita naturalmente in questo lievito e che forse sia più facile metterla in evidenza quando lo stipte viene tenuto in terreno liquido perchè il rimescolamento che precede il prelievo crea una maggiore probabilità di raccogliere anche qualche eventuale cellula mutata qualunque sia il punto del mezzo culturale in cui essa si sia originata. Perciò i ceppi varianti che si erano ottenuti per azione dei raggi X (vedi nota I) sembra possano essere considerati come vere mutazioni, dovute alle radiazioni, poichè nelle condizioni in cui erano state eseguite le prove, provenendo sempre le culture da agar, erano nelle condizioni meno favorevoli al dar luogo a variazioni spontanee.

RIASSUNTO

Da uno stipte di *Eutorulopsis dubia* Ciferri e Redaelli in cultura monocitogenetica e coltivato in brodo malto, furono isolati alcuni ceppi morfologicamente un poco diversi dall'originario, sia per la forma e la pigmentazione delle colonie che per la forma e le dimensioni delle cellule. I nuovi caratteri sono risultati stabili anche dopo numerosi passaggi. Uno di questi ceppi, il più interessante, ha cellule dotate di un corto e sottile prolungamento a forma di tubicino ed altre un poco più grosse e quasi sferiche. I ceppi sono ancora in studio e quindi non è possibile dire nulla di definitivo su queste particolari formazioni. Esaminate numerose colonie del ceppo originario provenienti sia da agar che da brodo malto parrebbe risultare che la possibilità di una variazione anche notevole sia insita naturalmente in questo lievito e che forse sia più facile metterla in evidenza quando lo stipte viene tenuto in terreno liquido, anzichè in solido, per ragioni puramente meccaniche.

SUMMARY

From *Eutorulopsis Dubia* Cif. et Red. in monocitogenetic culture and cultivated in malt broth, some progeny were isolated which morphologically differed but slightly from the original one, both as regards the form and pigmentation of the colonies and as regards the form and the dimensions of the cells. The new characters were found to be stable even after numerous platings and transfers over a prolonged period. One, the most interesting of these clones, has cells endowed with one long thin tubelike prolongation and with others slightly larger and almost spherical in shape. The study of these clones still continues and it is therefore impossible to make any final statment on these particular formations. From the examination of numerous colonies of the original yeast from agar or from malt broth, it would appear that the possibility of a variation and even a considerable one is lodged naturally in this yeast and that perhaps it is easier for purely mechanical reasons to demonstrate this when the yeast is kept in liquid rather than in solid media.

BIBLIOGRAFIA

- Ciferri R. e Redaelli P.: « Monografia delle *Torulopsidacee* a pigmento rosso ». Atti R. Ist. Bot. Univ. Pavia, 1927.
- Corberi E.: « Nuove forme di *Eutorulopsis dubia* Cif. et Red. per azione dei raggi X ». Boll. Soc. It. Biol. Sperim. Vol. XXV, fasc. 4-5, 1949.
- Diddens H. A. e Lodder J.: « Die Anaskosporogenen Hefen ». II Parte. Martinus Nijhoff, Amsterdam, 1942.
- Kluyver A. J. e Van Niel C. B.: « Uber Spiegelbilder erzeugende Hefenarten und die neue Hefengattung "*Sporobolomyces*" ». Centrl. Bakt. II Abt., Ed. 63, n. 1/8, pag. 1, 1925.
- Lodder J.: « Die Anaskosporogenen Hefen ». I Parte. Martinus Nijhoff, Amsterdam; 1934.
- Nyshiwaki Y.: « Uber eine neu Sporenbildende Rot Hefe ». Centrl. Bakt. II Abt., Band. 63, 1925.
- Will H.: « Beiträge zur Kenntnis rotgefärbter, niederer Pilze ». Centrl. Bakt., II Abt., Ed. 35, n. 6/10, 1912.
- Will H.: « Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze ohne Sporenbildung, welche in Braueribetrieben und in deren Umgebung Vorkommen ». Centrl. Bakt., Ed. 46, pag. 226, 1916.

Pervenuto in redazione il 1 luglio 1950.

Ancora su nuove forme di *Eutorulopsis dubia* Cif. et Red.

NOTA III

ELISA CORBERI - aiuto

Durante lo studio del ceppo di *Eutorulopsis dubia* Cif. et Red. di cui ebbi già a riferire in due precedenti note, mi occorre di osservare più volte (3), in culture non più giovani (di 9-4-4 mesi di età), ma provenienti da stipiti monocitogenetici, individui dalla forma molto diversa dalla solita tondeggiante caratteristica della *T.r.* (fig. 1). Si trattava di lieviti grossi e lunghi a forma quasi di salsiccia con tendenza a rimanere uniti a piccoli gruppetti di circa 2-25 individui (fig. 2). Osservai questo due volte in substrato liquido ed una in solido (al malto). Da principio ritenni queste forme un inquinamento, tanto erano diverse dalla *T.r.* Ma notando come i tre stipiti nei quali le avevo rinvenute provenissero da colonie isolate in tempi e modi diversi dalla *T.r.* e fossero tutti monocitogenetici, ne feci egualmente l'isolamento. L'aspetto delle colonie che ne risultarono era molto simile, sia per la forma che per la pigmentazione a quello delle colonie della *T.r.* originaria. Se ne distaccava solo un poco perchè la superficie invecchiando diveniva lievemente opaca e rugosa, mentre quella dello stipite originario è piuttosto liscia e lucida. Sfogliando la letteratura trovai in un vecchio lavoro di H. Will del 1912 la descrizione di un lievito rosso isolato da un'acqua di « brau » che ricordava molto i ceppi da me isolati. I disegni del lievito, riportati nella pubblicazione, mostravano anch'essi una grande somiglianza con queste nuove forme. Will classificava il suo lievito come appartenente alla famiglia delle *Mudecinaceae* di Link, (*Hyphomycetes*) e precisamente alla III^a sottosezione (*Cephalosporieae*) della prima sezione (*Hyalosporieae*); ad esso veniva dato il nome di *Cephalosporium rubescens* Schimon. Data la lontananza tra le due famiglie cui appartenevano la *T.r.* e quest'ultimo lievito, rimasi in dubbio sull'origine di questa forma, nonostante le culture fossero piuttosto simili tra loro e nonostante la ripetizione del rinvenimento in tre culture diverse. Senonchè recentemente riscontrai

le stesse forme ancora in un altro ceppo. Si trattava questa volta di uno stipite di *T.r.* (fig. 3) a patina apigmentata, di colore bianco, uno di quelli ottenuti mediante azione dei raggi X, dalla *T.r.* originaria, in cultura monocitogenetica. Anche qui, guardando al microscopio una cultura di 3 mesi osservai qualche forma grossa, a salsiccia, molto simile a quelle che avevo isolato dal ceppo originario, sopradescritte.

Isolai quindi anche questa ed ottenni così in cultura pura uno stipite (fig. 4) in tutto simile a quelli isolati in precedenza. L'unica differenza stava nel colore della patina: bianca per il ceppo isolato dalla colonia bianca, rosa per quelli isolati dalla rosa. Inoltre le dimensioni del germe erano lievemente più ridotte nel ceppo bianco che in quello rosa. Non ebbi quindi più alcun dubbio che si trattasse in ambedue i casi di una forma realmente derivata da quella nella quale fu osservata, originatasi o per mutazione e successiva selezione, oppure nuova fase di un ciclo a lunga scadenza cui potrebbero andar soggetti questi particolari lieviti. Attualmente i due nuovi stipiti, sia quello a patina rosa che quello a patina bianca, sono al 20° passaggio e mantengono costanti i loro caratteri sia macro che microscopici. Il potere fermentativo, da un primo saggio orientativo, non sembrerebbe molto diverso da quello della *T.r.* originaria. I due ceppi sono ancora in studio allo scopo di approfondire le relazioni che passano tra loro ed i ceppi dai quali sono stati isolati.

SUMMARY

From *Eutorulopsis dubia* Cif. et Red. in monocitogenetic culture a clone, very different from the parent, was isolated. This had very long cells and tendencies to remain united; the pigmentation of the new strain was like that of the original clone (red.) Subsequently from a mutant of the pigment (white) of the original culture a new clone was isolated exactly like that above described except for the character of the pigmentation of the colonies: white as the one from which it was derived.

BIBLIOGRAFIA

- Ciferri R. e Redaelli P. - Monografia delle *Torulopsidaceae* a pigmento rosso. - Atti R.I.B. Univ. Pavia - 1927.
- Corberi E. - Nuove forme di *Eutorulopsis dubia* Cif. et Red. per azione dei raggi X - Boll. Soc. It. Biol. Sper. - Vol. XXV - fasc. 4-5, 1949.
- Corberi E. - Nuove forme di *Eutorulopsis dubia* Cif. et Red. - Nota II - Ann. Micr. - Vol. IV - fasc. IV, 1950.
- Lodder J. - *Die Anaskosporogenen Hefen.* - II parte - Martinus Nijhoff - Amsterdam, 1934.
- Will H. - Die Beiträge zur Kenntnis rotgefärbter niederer Pilze - Centrl. - Bakt. II Abt., Ed. 35, n. 6/10, 1912.

Pervenuto in redazione il 1 dicembre 1950.

Direttore respons.: Prof. C. ARNAUDI - Autorizzaz. del Tribunale di Milano 12-11-1948 N. 837

TAVOLA I

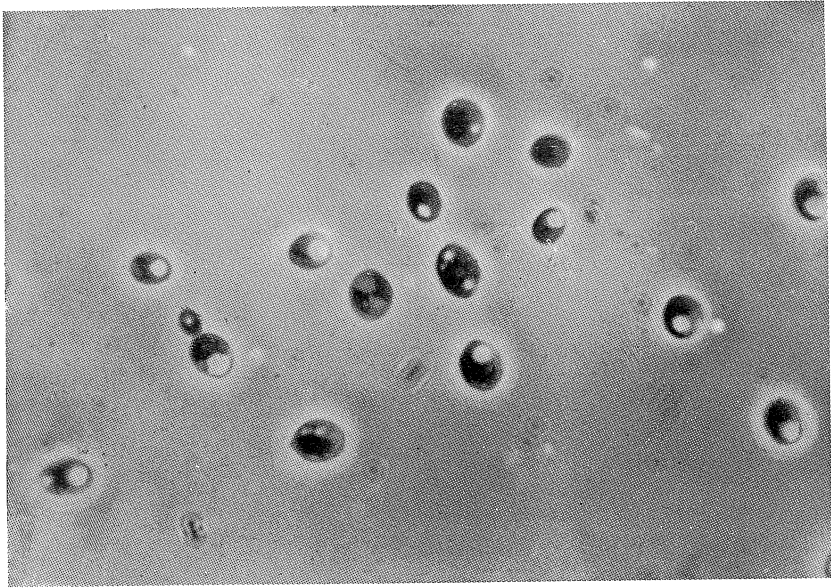


Fig. 1

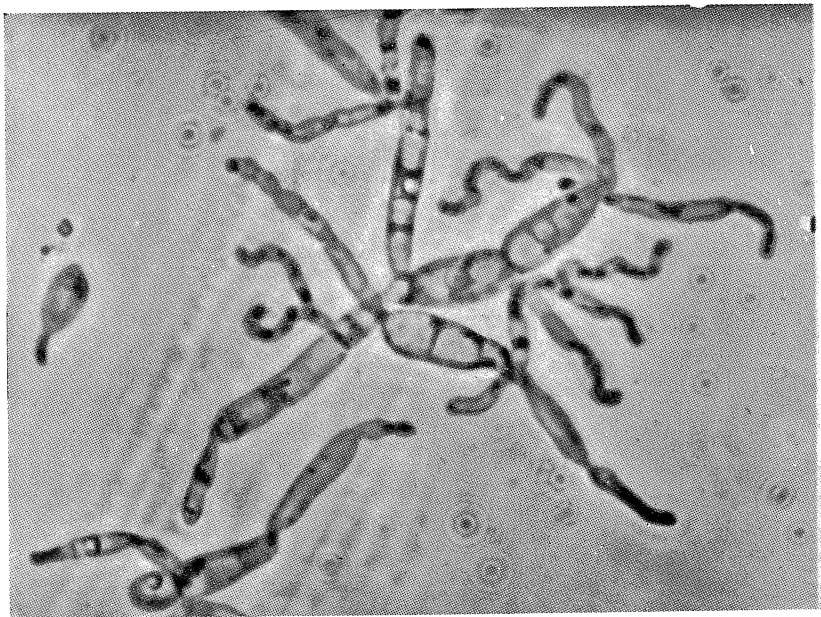


Fig. 2

Microfotografie a contrasto di fase - ingr. $\times 2.200$

TAVOLA II

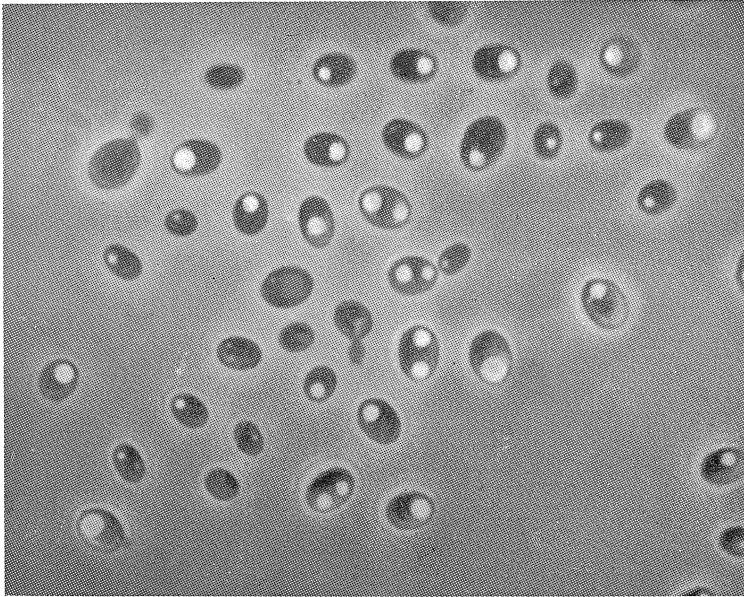


Fig. 3

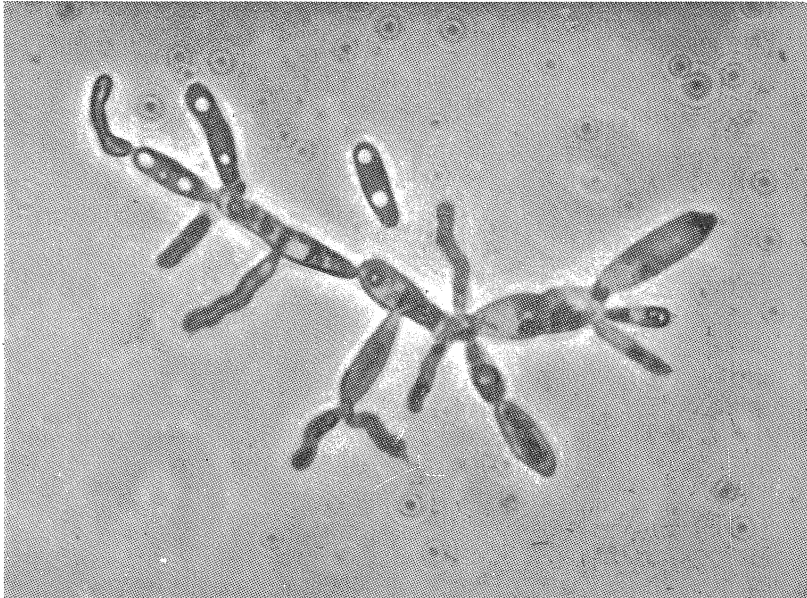


Fig. 4

Microfotografie a contrasto di fase - ingr. $\times 2.200$

STAMPATO COI TIPI DELLA

TIPOGRAFICA MILANESE

VIA FARINI, 5 - TEL. 67.916