

43. M. PERGOLA. — Sopravvivenza ultratrentennale di batteri aerobi asporigeni.

Riassunto. — Si riferiscono indagini sulla sopravvivenza, o meno, di 35 culture batteriche, datanti da un minimo di anni 11 ad un massimo di anni 37.

Si tratta di batteri aerobi asporigeni, coltivati in tubi di agar obliquo saldati alla fiamma senza previa estrazione dell'aria.

Questi batteri, comprendenti 30 stipiti di bacilli e 5 di cocchi, provengono in massima parte da sostanze alimentari, sospette di aver provocato casi di intossicazione nell'uomo, ed appartengono prevalentemente al gruppo del *B. Coli* o del *B. Proteus*.

Di 35 culture se ne sono riscontrate ancora vive 23, tutte di bacilli e nessuna di cocchi. E' particolarmente interessante che fra le culture sopravvissute, insieme con 9 di 20 anni ed oltre (fino a 26 anni) se ne sono trovate 4 a sopravvivenza ultratrentennale e precisamente 3 di 36 anni ed 1 di 37.

Tutti gli stipiti batterici ancora vivi dopo tanto lunghi periodi di tempo hanno conservato i caratteri e le proprietà che avevano originariamente, compresi il potere patogeno ed il tossigeno.

Résumé. — On relate les résultats des investigations sur la survivance ou non de 35 cultures bactériennes, vieilles depuis un minimum de 11 ans à un maximum de 37.

Il s'agit de bactéries aérobies asporigènes, cultivées dans des tubes d'agar oblique, soudés à la flamme sans extraction préalable de l'air.

Ces bactéries, comprenant 30 races de bacilles et 5 de cocci, proviennent pour la plupart de substances alimentaires, suspectées d'avoir provoqué des cas d'intoxication dans l'homme, et appartiennent surtout au groupe du *B. coli* ou du *B. proteus*.

Des 35 cultures, on en a trouvé 23 encore vivantes, toutes de bacilles et aucune de cocci. Il est particulièrement intéressant de constater que, parmi les cultures survivantes, outre 9 vieilles de 20 ans et plus (jusqu'à 26 ans), il s'en est trouvé 4 dont la survivance datait de plus de 30 ans, et précisément 3 vieilles de 36 ans et 1 de 37.

Toutes les races bactériennes, encore vivantes après des périodes de temps si prolongées, ont conservé les caractères et les propriétés qu'elles avaient originairement, y compris le pouvoir pathogène et le pouvoir toxigène.

Summary. — A report on the survival of 37 bacteria cultures dating from a minimum of 11 years to a maximum of 37 years.

The report concerns asporigenous aerobitic bacteria cultivated in oblique agar flame-sealed tubes without a previous extraction of the air.

These bacteria, comprising 30 speciaes of bacilli and 5 of cocci, were obtained mostly from food-staffs suspected of causing intoxication in man. They belong prevalently to the groups of *B. Coli* or *B. Proteus*.

Out of 35 cultures checked, 23 are still living, all of which are bacilli and none cocci. It is especially interesting to note that the cultures which survived ranges from to 9 to 20 years and over (26 years) of age. Four of them have survived for over 30 years, and to be precise, 3 for 36 years, and one for 37.

All the bacteria living after such long periods, have preserved their original characteristics, including their pathogenic and toxic powers.

Zusammenfassung. — Es werden die Prüfungsergebnisse bezüglich Überlebens oder Absterbens von 35 Bakterienkulturen mitgeteilt, deren Alter von einem Minimum von 11 Jahren bis zu einem Maximum von 37 Jahren schwankt. Es wurden asporigene aerobe Bakterien geprüft die in geeigneten, mit Flamme ohne vorhergehende Luftentleerung zugeschmolzenen Agar-Röhren gezüchtet worden waren. Diese Bakterien, 30 Bazillen- und 5 Kokkenstämme umfassend, stammen zum grössten Teil aus Lebensmitteln welche verdächtigt werden Fergiftungsfälle von Menschen hervorgerufen zu haben; sie gehören hauptsächlich zur Gruppe des *B. Coli* und des *B. Proteus*. Von den untersuchten Kulturen wurden 23 überlebend gefunden, und zwar waren es ausschliesslich Bazilluskulturen, während alle Kokkenkulturen abgestorben waren. Besonders interessant ist der Umstand dass unter den überlebenden Kulturen, von welchen 9 ein Alter von 20 Jahren und darüber (bis 26 Jahre) haben, vier gefunden wurden die über 30 Jahre alt sind, und zwar 3 Kulturen mit 36 Jahren und eine mit 37 Jahren.

Alle nach einer so langen Zeit überlebend gefundenen Bakterienstämme wiesen ihre ursprünglichen Kennzeichen und Eigenschaften auf, einschliesslich ihrer pathogenen und toxigenen Wirkung.

Riprendendo lo studio di batteri isolati da sostanze alimentari, incriminate di aver provocato casi di intossicazione nell'uomo, ho ritrovato un gruppo di 35 culture di batteri aerobi asporigeni, in tubi di agar comune obliquo, saldati alla fiamma senza previa estrazione dell'aria e lasciati a temperatura ambiente.

Tali culture datavano ormai da parecchio tempo e precisamente da un minimo di 11 anni ad un massimo di 37 anni, ma si presentavano, all'osser-

vazione macroscopica, ben conservate e cioè con patina batterica di aspetto normale come di culture recenti e con liquido di condensazione.

Dei nuovi passaggi che ho praticato, facendo una semina piuttosto abbondante in agar obliquo appena aperto il tubo della vecchia cultura, alcuni hanno dato esito positivo, altri, esito negativo, dimostrando così la sopravvivenza del germe nel primo caso e la sua morte nel secondo.

Riferisco nella seguente tabella I i dati relativi alle mie 35 culture.

Riguardo alla provenienza, i 35 stipiti batterici in esame si possono così suddividere:

- 1 (n. 1) corynebatterio isolato da ulcerazione cutanea;
- 1 (n. 21) bacillo isolato da urina;
- 2 (n. 22, 23) bacilli isolati da escrementi;
- 1 (n. 17) cocco isolato da formaggio pecorino;
- 3 (n. 2, 18, 19) bacilli isolati da carne di maiale conservata;
- 2 (n. 34, 35) bacilli isolati da sarda fresca;
- 2 (n. 24, 25) bacilli isolati da sardine sott'olio;
- 3 (n. 26, 27, 28) bacilli isolati da tonno fresco;
- 4 (n. 13, 14, 15, 16) cocchi isolati da tonno sott'olio;
- 16 (n. 3 - 12, 20, 29 - 33) bacilli isolati da tonno sott'olio.

Totale 35

A prescindere, dunque, da 4 stipiti batterici (n. 1, 21, 22, 23) isolati da materiali patologici, gli altri 31 provengono tutti da sostanze alimentari e precisamente 5 (n. 26, 27, 28, 34, 35) da pesci (tonno e sarde) allo stato fresco, 1 (n. 17) da formaggio pecorino ed i rimanenti 25 da alimenti conservati, sospetti di aver provocato casi di avvelenamento. In questo ultimo gruppo troviamo 3 campioni (n. 2, 18, 19) di carne di maiale e 22 campioni di pesci sott'olio e più precisamente: 2 (n. 24, 25) di sardine sott'olio e 20 (n. 3-16, 20, 29-33) di tonno sott'olio. Vi è dunque una notevole prevalenza dei pesci conservati sott'olio e specialmente del tonno: ciò significa che la più frequente causa degli avvelenamenti alimentari, dei quali abbiamo avuto occasione di occuparci, risulta rappresentata dal tonno sott'olio.

Ad eccezione del corynebatterio elencato al n. 1 e dei bacilli elencati ai n. 2, 3, 10, 11, tutti gli altri 30 sono quei batteri che in miei precedenti studi ho qualificato « ictiotossigeni » perchè, sviluppandosi — per inquinamento naturale o artificiale — in pesci (tonno, sardine) in sostanza, freschi o conservati sott'olio, oppure nel loro estratto acquoso, vi producono un principio tossico, molto attivo per gli animali da esperimento. Di questi 30 batteri, 5 (n. 13, 14, 15, 16, 17) sono cocchi e 25 sono bacilli appartenenti prevalentemente al gruppo del B. Coli o del B. Proteus.

TABELLA I

N. d'ordine	Designazione	PROVENIENZA	Morfologia B = Bacillo C = Cocco	Anni di età della cultura	Sopravv. : + Morte : —
1	B. C.	Ulcerazione cutanea	B (Coryneb.)	22	—
2	B. L.	Carne di maiale insaccata	B	19	+
3	62	Tonno sott'olio	B	36	—
4	64	Tonno sott'olio	B	11	+
5	64	Tonno sott'olio	B	13	+
6	64	Tonno sott'olio	B	15	+
7	64	Tonno sott'olio	B	23	+
8	64	Tonno sott'olio	B	26	+
9	64	Tonno sott'olio	B	37	+
10	65	Tonno sott'olio	B	36	+
11	67	Tonno sott'olio	B	36	—
12	75	Tonno sott'olio	B	36	+
13	T. A.	Tonno sott'olio	C	36	—
14	T. C. L.	Tonno sott'olio	C	36	—
15	T. N.	Tonno sott'olio	C	22	—
16	T. P. 5	Tonno sott'olio	C	20	—
17	F. P.	Fermaggio pecorino	C	23	—
18	B. Coppa	Carne di maiale conservata	B	20	+
19	Coppa Cing.	Carne di maiale conservata	B	22	+
20	T. A. P.	Tonno sott'olio	B	36	+
21	U 3	Urina	B	20	+
22	P. 1	Escreato	B	20	+
23	P. 2	Escreato	B	20	+
24	S.M.C. 2 b	Sardine sott'olio	B	22	+
25	S.M.C. 3 b	Sardine sott'olio	B	20	+
26	Tafr. 1	Tonno fresco	B	13	+
27	Tafr. 2	Tonno fresco	B	13	+
28	Tafr. 3	Tonno fresco	B	13	+
29	T. 1936	Tonno sott'olio	B	12	+
30	T. 1937.5	Tonno sott'olio	B	11	—
31	T. 1937.11	Tonno sott'olio	B	11	—
32	T. 1937.13	Tonno sott'olio	B	11	—
33	T. B. 4	Tonno sott'olio	B	22	—
34	Sag. 2	Sarda fresca	B	13	+
35	Sag. 3	Sarda fresca	B	13	+

Riassumo nella seguente Tabella II le varie età delle culture e la loro rispettiva sopravvivenza o morte.

TABELLA II

Età delle culture in anni	Numero complessivo delle culture delle singole età	Culture delle singole età	
		v i v e	m o r t e
11	4	1 (stip. n. 4)	3 (stip. n. 30, 31, 32)
12	1	1 (stip. n. 29)	—
13	6	6 (stip. n. 5, 26, 27, 28, 34, 35)	—
15	1	1 (stip. n. 6)	—
19	1	1 (stip. n. 2)	—
20	6	5 (stip. n. 18, 21, 22, 23, 25)	1 (stip. n. 16)
22	5	2 (stip. n. 19, 24)	3 (stip. n. 1, 15, 33)
23	2	1 (stip. n. 7).	1 (stip. n. 17)
26	1	1 (stip. n. 8)	—
36	7	3 (stip. n. 10, 12, 20)	4 (stip. n. 3, 11, 13, 14)
37	1	1 (stip. n. 9)	—
Tot. 35		23	12

Le culture in esame non erano state allestite all'apposito scopo di indagarne la sopravvivenza e perciò la loro età — sulla quale ha influito soltanto il caso — risulta non regolarmente, bensì irregolarmente progressiva. Comunque, già abbastanza notevoli sono le età più basse (11, 12, 13 anni) che pur superano il decennio, mentre attraverso periodi di varia entità si arriva a 37 anni (*), cioè all'età più elevata che mi sia capitato di riscontrare.

Di tale età ho trovato una sola cultura ed è risultata viva. Essa si riferisce allo stipite siglato « 64 » (Tab. I, n. 9) ed è precisamente il primo dei batteri detti « ictiotossigeni » isolato da tonno sott'olio, sospetto di aver provocato casi di intossicazione nell'uomo. Di questo medesimo stipite batte-

(*) Naturalmente il computo degli anni è approssimativo, nel senso che le culture non sono state aperte proprio il giorno in cui scadeva quel dato numero di anni, ma, di solito, qualche tempo prima o dopo. Così, per esempio, la cultura la cui età è calcolata di 37 anni è stata allestita il 30 marzo 1911 ed è stata aperta per il nuovo passaggio il 13 febbraio 1948.

Anche le altre culture sono state aperte e riseminate tutte nel 1948.

rico ho rinvenuto pure altre cinque culture (Tab. I, n. 4, 5, 6, 7, 8) datanti rispettivamente da 11, 13, 15, 23 e 26 anni, che — come è ovvio — sono risultate tutte vive, dato che era ancora viva la cultura di 37 anni.

Come risulta dalla Tab. II in ognuna delle età capitate in osservazione si sono rinvenute culture vive, tra le quali meritano particolare segnalazione, per il ragguardevole periodo di sopravvivenza raggiunto, le 3 culture di 36 anni nonché quella già ricordata di 37 anni.

Dalle vecchie culture, dopo il loro passaggio in agar, ho allestito anche preparati microscopici, che ho colorato secondo il metodo Gram. Ho potuto così rilevare che i batteri delle culture vecchie, in confronto ai loro omologhi di culture recenti, appaiono più esili, a colorazione piuttosto pallida, ed alcuni di essi, tra gli stipiti a forma bacillare, presentano punti più intensamente colorati, che danno l'impressione come di minuti granuli che siano venuti a costituirsi per addensamento del protoplasma batterico alle estremità del corpo bacillare. Ciò è quanto dimostra la fig. 1, che riproduce un preparato allestito dalla cultura di 37 anni dello stipite 64, e più evidentemente ancora la fig. 2 (batterio contrassegnato colla freccia) che è la fotografia eseguita al microscopio elettronico da un preparato della stessa cultura.

La fig. 3 riproduce un preparato allestito dal primo nuovo passaggio in agar della suddetta cultura di 37 anni e mostra come i batteri riassumano subito il loro aspetto normale. Confrontando tra loro le fig. 1 e 3 risalta nettamente la differenza dell'aspetto offerto dal batterio, secondo la sua provenienza da cultura recente (fig. 3) o da cultura vecchia (fig. 1).

Le formazioni granulari, di cui sopra, si sono rinvenute con una certa frequenza negli stipiti riscontrati ancora vivi, e che alle relative indagini hanno dimostrato, inoltre, di non aver perduto durante l'invecchiamento nessuna delle loro proprietà originarie, tra le quali meritano particolare menzione il potere patogeno ed il tossigeno.

E qui, a proposito del potere tossigeno, è interessante ricordare che, secondo i miei studi, il principio tossico in parola, tanto attivo negli animali da esperimento, è, *con tutta probabilità, istamina, o sostanza istaminosimile*. L'istamina — come si sa — deriva dall'istidina per decarbossilazione, per sottrazione cioè del gruppo COO, provocata o per opera di batteri che agiscono nell'intestino (B. Coli, B. Proteus ecc., al gruppo dei quali — come ho detto — appartengono appunto in gran parte i miei batteri ictiotossigeni) o per altri processi che si svolgono nell'intimità dei tessuti.

Per quanto riguarda i batteri istaminogeni conservati in cultura pura, si ritiene, in generale, che la loro proprietà di produrre istamina sia piuttosto labile e vada quindi scomparendo in un periodo di tempo non tanto lungo. Merita perciò particolare rilievo il fatto che i miei stipiti ictiotossigeni si sarebbero invece mantenuti istaminogeni non solo dopo numerosi

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

Fig. 1.

Preparato allestito dalla agar-cultura di 37 anni dello st pite 64 — Colorazione secondo il metodo Gram — Si vedono numerosi granuli più o meno scuri, che corrispondono a punti di addensamento del protoplasma batterico.



Fig. 1 (Ingrandimento $\times 900$)

Fig. 2.

Fotografia eseguita al microscopio elettronico, riproducente batteri della stessa cultura della Fig. 1 — Nel batterio contrassegnato colla freccia spiccano nettamente due masse scure in posizione polare, corrispondenti ai granuli rilevati nella Fig. 1.

Fig. 3.

Preparato allestito da agar-cultura di 2 giorni, primo nuovo passaggio in agar della stessa cultura della Fig. 1 — Colorazione secondo il metodo Gram — Si vedono gli elementi bacillari normali dello stipite 64, elementi cioè di aspetto e colorazione uniformi, quali appunto si rinvenivano nelle culture recenti.

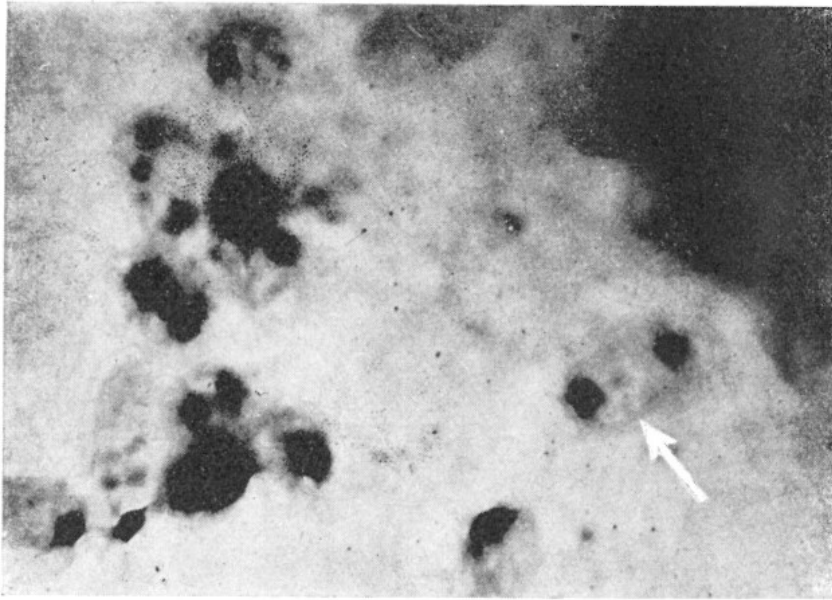


Fig. 2 (Ingrandimento $\times 18.000$)

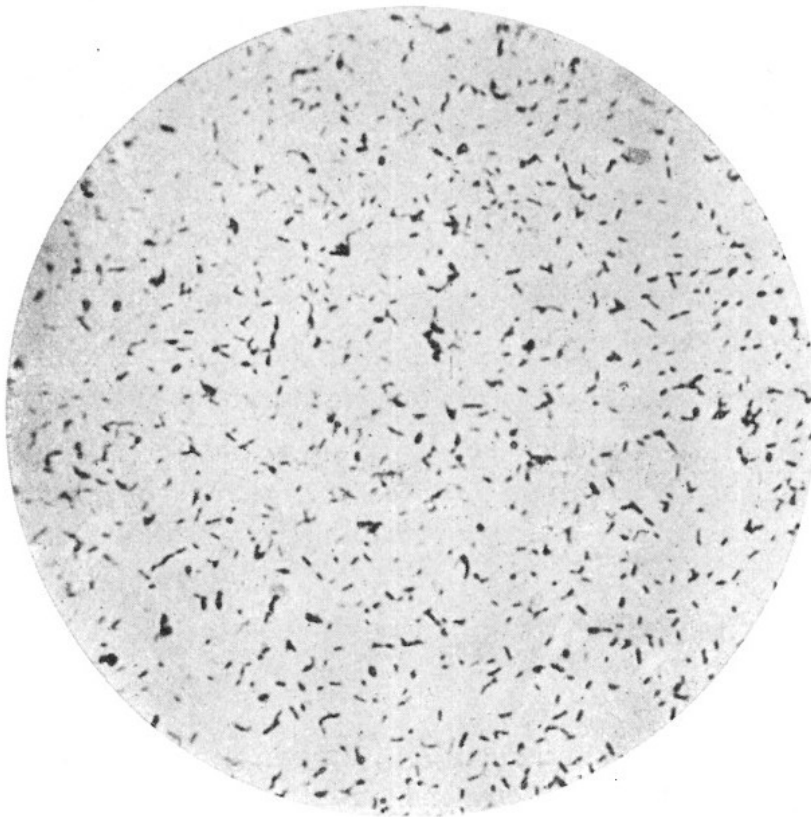


Fig. 3 (Ingrandimento $\times 900$)

passaggi in substrato artificiale (agar), quanti sono quelli subìti dall'epoca del loro isolamento fino ad oggi, ma pure — come ora si è qui messo in evidenza — dopo invecchiamento perfino di 36 e 37 anni. Per essi, dunque, il potere istaminogeno sarebbe una proprietà tutt'altro che labile.

Le 23 culture risultate ancora vive sono tutte di bacilli e nessuna di cocchi. Se ne potrebbe dedurre che in linea generale i bacilli siano dotati di una longevità maggiore di quella dei cocchi? Mi sembra che una simile deduzione non sarebbe sufficientemente fondata, in quanto, visto che su 35 culture esaminate 30 erano di bacilli e solo 5 di cocchi, era ovvio — anche dal punto di vista puramente numerico — attendersi che sarebbe stato più probabile rinvenire culture vive tra quelle di bacilli che non tra quelle di cocchi. Tuttavia, come si rileva dalla Tab. I, le 5 culture di cocchi sono: 1 (n. 16) di 20 anni, 1 (n. 15) di 22 anni, 1 (n. 17) di 23 anni e 2 (n. 13 e 14) di 36 anni. Orbene, di queste medesime quattro età si hanno complessivamente anche 15 culture di bacilli, delle quali sono risultate vive:

di 20 anni:	5 culture su 5 saggiate;
di 22 anni:	2 culture su 4 saggiate;
di 23 anni:	1 cultura su 1 saggiata;
di 36 anni:	3 culture su 5 saggiate;

Totale . . .	11	15
--------------	----	----

Su 15 culture di bacilli delle età suindicate, ne sopravvivono dunque 11, e cioè il 73%.

Se questa proporzione si fosse verificata anche per le culture di cocchi, avremmo dovuto rinvenirne sopravviventi 3 in luogo di nessuna.

Questo rilievo potrebbe giustificare in certo qual modo l'impressione che i cocchi siano dotati di vitalità meno duratura di quella dei bacilli. Ma il troppo scarso numero di stipiti di cocchi capitati in osservazione non permette di ricavare alcuna deduzione sicura in proposito.