

44. B. BABUDIERI. — Natura delle cosiddette "S-Formen", delle leptospire. Loro identificazione con *Hyphomicrobium vulgare* Stutzer e Hartleb. Studio di quest'ultimo germe.

Riassunto. — Da una cultura di *Leptospira canicola inquinata*, l'A. isola in coltura pura un microorganismo ovoidale, provvisto di un filamento, capace di moltiplicarsi per gemmazione, filtrabile. L'A. studia, specie con l'ausilio del microscopio elettronico, la morfologia di tale germe e le sue caratteristiche culturali. Egli ritiene che esso possa essere identificato con *Hyphomicrobium vulgare*. L'A. discute la posizione sistematica di questo germe e specie le affinità che esso ha con *Rhodomicrobium vannielii*. Egli ritiene che questi due germi debbano essere compresi in un'unica famiglia, quella delle *Hyphomicrobiaceae*, la quale dovrebbe appartenere alla sottosezione delle *Mycophytae* e più probabilmente alla classe delle *Phycomycetales*.

Résumé. — D'une culture de *Leptospira canicola inquinata* l'Auteur a isolé, en culture pure, un microorganisme ovoïdal, pourvu d'un filament, capable de se reproduire par gemmation et filtrable. L'Auteur a étudié, surtout à l'aide du microscope électronique, la morphologie de ce germe et ses caractéristiques culturelles.

Il estime qu'on peut l'identifier avec *Hyphomicrobium vulgare*. L'auteur discute ensuite la position systématique de ce germe et particulièrement les affinités qu'il a avec *Rhodomicrobium vannielii*. Il pense que ces deux germes doivent être inclus dans une famille unique, celle des *Hyphomicrobiaceae*, qui devrait appartenir à la sous-section des *Mycophytae* et plus probablement à la classe des *Phycomycetales*.

Summary. — From a contaminated culture of *Leptospira canicola* the author has isolated in pure culture a filtrable microorganism, ovoidal in shape, provided with a filament and capable of multiplying by budding. The author has studied by means of the electron microscope, the morphology of this organism and its cultural characteristics. He considers that it can be identified with *Hyphomicrobium vulgare*. The author discusses the systematic position of the organism and points out its similarity to *Rhodomicrobium vannielii*. He states that these two microorganisms belong to a simple family, the *Hyphomicrobiaceae*, which should form part of the subsection *Mycophytae* and most probably of the class of *Phycomycetales*.

Zusammenfassung. — Aus einer verunreinigten *Leptospira canicola*-Kultur hat Verf. in Reinkultur einen filtrierbaren Mikro-organismus mit

fadenförmigen Ansatz isoliert, der sich durch Knospenbildung vervielfältigt. Verf. hat hauptsächlich mittels des Elektronenmikroskops die Morphologie dieses Keimes und seine Kulturbedingungen untersucht. Er ist der Ansicht, dass dieser Keim mit *Hyphomicrobium vulgare* identifiziert werden kann und bespricht die systematische Stellung dieses Keimes und seine Ähnlichkeit mit *Rhodomicrobium vannielii*. Anscheinend gehören beide Keime zu der gleichen Familie, der *Hyphomicrobiaceae*, die zur Unterabteilung der *Mycophytae* gehören sollte, und wahrscheinlicher zur Klasse der *Phycomycetales*.

In un lavoro pubblicato nel gennaio del 1947 su « Medizinische Klinik », JAKOB (1) describe, in una cultura di *Leptospira canicola* (ceppo Schueffner-Gaetgens) alcune particolari formazioni globose situate alla estremità di un sottile filamento, e alle volte provviste di un esilissimo flagello. L'A. studia tali formazioni con l'ausilio del microscopio elettronico ed arriva alla conclusione che si tratti di un particolare stadio del ciclo vitale della leptospira. Egli le accosta ai reperti di immagini sporosimili che molti altri ricercatori avevano già descritto in culture di leptospire osservate al paraboloide o colorate con l'impregnazione argenticca. Infatti in alcuni casi egli sarebbe riuscito ad osservare nell'interno di queste « S-Formen », come egli le denomina, una leptospira strettamente raggomitolata.

Queste formazioni sono state viste da Jakob successivamente (2) anche in un ceppo di *Leptospira ictero-haemorrhagiae*, pure della collezione di Gaetgens, e in un ceppo di *L. canicola* (M. 468) proveniente da Borg Petersen.

Avuto dalla cortesia di Jakob il ceppo di *L. canicola* da questi studiato, l'ho sottoposto ad un accurato esame. Pur avendo constatato nella cultura le formazioni descritte da Jakob, non posso però aderire alle sue conclusioni.

Riporto qui le ricerche eseguite ed i risultati ai quali sono giunto:

Ho coltivato il ceppo di leptospire su terreno di Korthof, sia originale, sia da me modificato, alla temperatura di 28° e di 37°. L'aspetto macroscopico del terreno di cultura era pressochè normale; il liquido si manteneva limpido o appena appena opalescente se lo sviluppo della leptospira era molto abbondante: in culture però vecchie di alcune settimane si notava sul fondo della provetta uno scarsissimo sedimento granulare, biancastro, assente o più scarso nelle culture di altre leptospire.

Esaminata a fresco, al microscopio ottico, in campo chiaro, la cultura non permette di osservare alcun microorganismo.

In campo scuro è invece possibile scorgere, accanto alle normali leptospire, un certo numero, in genere minore di queste, di minute formazioni ovulari, per lo più situate all'estremità di un sottile filamento rigido, ben rifrangente. Alle volte ad ambedue le estremità del filamento è possibile vedere uno di tali corpiccioli, talvolta di dimensioni diseguali. Si scorge anche un certo numero di formazioni sprovviste di filamento, oppure provviste di un filamento cortissimo. Il diametro e la rifrangenza del filamento sono press'a poco uguali a quelle delle leptospire, però esso si distingue facilmente da queste per l'assenza di spore e per una sua certa maggiore rigidità.

Le formazioni qui descritte si trovano sospese a tutti i livelli del terreno di cultura; tendono però a depositarsi sul fondo, ed infatti il sedimento più sopra descritto è quasi esclusivamente costituito da tali forme, alle volte tra di loro intrecciate.

Queste « S-Formen » sono in genere immobili: prolungando però l'osservazione, e specie se si tratta di culture recenti, si vede qualche raro granulo, di dimensioni in genere un po' minori della norma, sia libero, sia legato ad un filamento cortissimo, il quale percorre rapidamente e in tutti i sensi il campo microscopico. Del pari si può vedere, ma molto raramente, qualche granulo legato ad un filamento, in preda ad un irregolare movimento rotatorio, limitato però ed impacciato dal filamento a cui è legato.

Date le minute dimensioni di queste formazioni, non è possibile riconoscere in esse una struttura.

L'osservazione al microscopio a ritardo di fase conferma quanto si vede al paraboloide e non arricchisce il reperto di altri particolari.

In preparati fissati al calore o con alcool metilico e colorati col Giemsa, le « S-Formen » appaiono come minuscoli granuli colorati in parte in rosso carminio, in parte in violetto. Non sono visibili, se non con estrema difficoltà, i filamenti. Questi sono invece bene evidenti se il preparato viene colorato con lo Ziehl o con il violetto di genziana o sottoposto all'impregnazione argentea secondo il metodo di Fontana e Tribondeau (fig. 1).

Anche con queste colorazioni non è possibile osservare una particolare struttura nell'interno dei corpiccioli. Si osserva soltanto col Giemsa, una zona più intensamente colorata in corrispondenza all'inserzione del filamento, mentre la parte distale è più chiara e alle volte anche otticamente vuota. Lo stesso s'osserva con l'impregnazione argentea.

Il germe non assume il Gram.

Date le sue limitate dimensioni, era necessario studiare il microorganismo in questione con il microscopio elettronico.

La tecnica usata per l'allestimento dei preparati è stata quella abituale della fissazione con acido osmico e del lavaggio degli elementi con acqua bi-

distillata, mediante centrifugazioni ripetute. I preparati sono stati osservati sia direttamente, sia dopo ombratura con vapori di cromo (1).

Nell'osservazione dei preparati non ombrati i granuli hanno l'aspetto di corpiccioli in genere ovali, alle volte con un'estremità arrotondata e una appuntita che li fa stranamente assomigliare a semi di limone (figure 2, 3, ecc.). Il diametro maggiore di queste forme s'aggira sul μ , quello minore è di circa 0,5—0,6 μ . I corpiccioli risultano limitati da una membrana meno netta di quella batterica e il loro protoplasma appare in alcuni casi intensamente ed omogeneamente opaco (fig. 3), mentre in altri si nota una zona opaca, situata distalmente rispetto all'inserzione del filamento, e una meno opaca, prossimale a questo (figg. 5, 6). In genere la distinzione fra le due zone è segnata da una linea trasversale ben netta (fig. 13), altre volte invece dalla zona più opaca parte una fascia scura che arriva fino all'inserzione del filamento o s'addentra un pò in esso (fig. 10). In altri casi infine l'intero protoplasma è relativamente chiaro e appare soltanto un po' addensato alla periferia (fig. 9).

In qualche raro caso, come già visto anche da JAKOB (1, 2) da una delle estremità del corpicciolo parte un esilissimo flagello ondulato (figure 9, 11, 14). Queste forme corrispondono probabilmente a quelle che nell'osservazione a fresco si vedono mobili. La morfologia delle forme flagellate non differisce per il resto da quella delle forme non flagellate.

I filamenti partono dai corpiccioli ovali e costituiscono un vero prolungamento del loro protoplasma. In essi si distingue una zona centrale più scura contornata da due zone meno opache (membrana?).

Lo spessore di tali filamenti s'aggira sul 0,1 μ , la loro lunghezza è molto variabile e può raggiungere anche alcune decine di μ .

Il filamento, ben differenziabile per le sue caratteristiche morfologiche, anche a prescindere dalla mancanza di spire, dal corpo di una leptospira, ha in genere un decorso rettilineo ed un aspetto rigido, più di rado ha un andamento sinuoso (fig. 15). In qualche caso il filamento si può anche biforcare (fig. 5) oppure può portare, sul suo decorso, un altro corpicciolo ovale (figg. 6, 8).

In qualche caso, specie in vecchie culture, il filamento è omogeneo, chiaro e sembra costituito da una membrana vuota di protoplasma, oppure in esso s'osservano soltanto alcuni brevi tratti opachi (fig. 14). Il filamento non è mai settato.

In genere i filamenti portano ad ambedue le loro estremità un corpicciolo:

(1) Ringrazio il Dr. C. Castagnoli per l'assistenza tecnica prestatami nell'osservazione con il microscopio elettronico.

alle volte uno di questi ha dimensioni ed aspetto normale, mentre l'altro è molto più piccolo ed assomiglia ad una giovane gemma (fig. 7).

L'osservazione dei preparati ombrati conferma quanto abbiamo riferito più sopra. Si osserva però che lo spessore del protoplasma appare in genere piuttosto uniforme, il che fa pensare che le differenze d'opacità che si osservano nei preparati non ombrati si debbano riferire più a differenze di densità che a differenze di massa del protoplasma.

L'osservazione di numerosi preparati permette di ricostruire come segue il ciclo vitale del microorganismo in questione: si parte da un corpicciolo libero, ovale, intensamente opaco. Da un'estremità di questo prende origine una propaggine lievemente strozzata alla sua base e contenente al suo centro un granulo più opaco (figg. 2, 3). Questa propaggine si allunga sempre di più, fino a dare origine ad un filamento più o meno lungo, che talvolta può ramificarsi (fig. 5). Ad un certo momento all'altra estremità del filamento si forma un ingrossamento (figg. 4, 5) una vera gemma che aumenta progressivamente di dimensioni fino a dare origine ad un corpicciolo perfettamente simile a quello d'origine. Ad un certo momento, in corrispondenza al suo punto d'inserzione il filamento si strozza (fig. 12), diventa più opaco e sempre più sottile fino a rompersi e a liberare il corpicciolo. Il ciclo così ricomincia.

I corpiccioli in uno stadio del loro sviluppo sono provvisti, per un tempo presumibilmente molto breve, di un flagello (figg. 9, 11). Si può anche affacciare l'ipotesi che tali forme flagellate possano avere il significato di gameti. Non m'è riuscito però di osservare forme che possano essere interpretate come aspetti di coniugazione sessuale.

Nelle mie osservazioni non ho mai notato qualche fatto che potesse far pensare che queste formazioni fossero legate alle leptospire o fossero da loro dipendenti. Per poter però confermare tale opinione, era necessario separarle in cultura dalle leptospire. Ciò fu possibile ottenere con vari procedimenti, e più precisamente: I. Con la filtrazione della cultura per filtro Seitz. Con tale procedimento riuscii a trattenere sul filtro le leptospire, mentre il microorganismo in questione fu spesso capace di attraversare il filtro; II. Con il riscaldamento della cultura per 5-10' a 50° riuscii ad eliminare le leptospire mentre il microorganismo sopportò bene tale temperatura; III. Con l'aggiunta di 0,1 U.O. di penicillina per cc di cultura, riuscii pure ad eliminare le leptospire, lasciando in vita il microorganismo; IV. Lo stesso risultato fu ottenuto lasciando essiccare, per pochi minuti a temperatura ambiente, una ansata di cultura.

Il microorganismo così isolato fu poi coltivato in terreno di Korthof dove si sviluppò normalmente attraverso numerosi passaggi, senza che mai vi ricomparisse leptospire.

D'altro lato, centrifugando a lungo e ripetutamente la cultura e trapian-

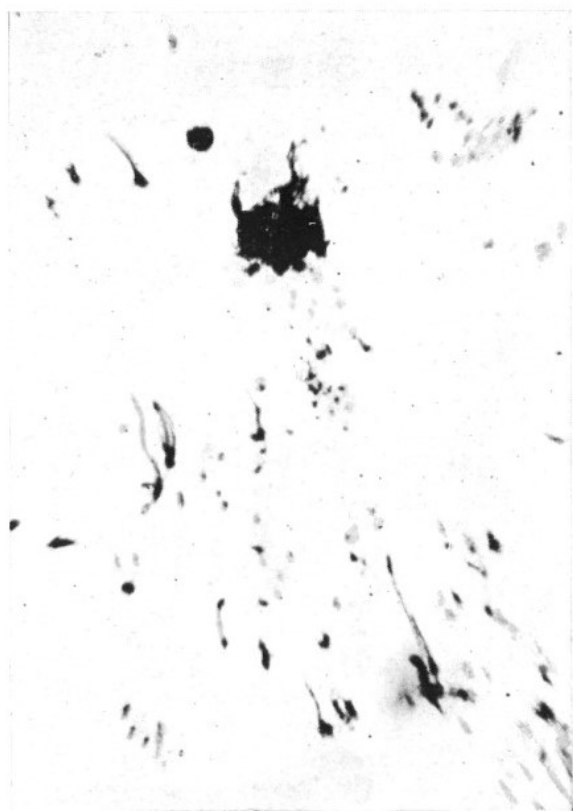


Fig. 1. - *Hyphomicrobium vulgare*, cultura in acqua peptonata. Colorazione secondo Fontana e Tribondeau.



Fig. 2. - Giovani elementi di *H. vulgare*.



Fig. 3. - Giovani elementi di *H. vulgare* a protoplasma opaco: comparsa del filamento.

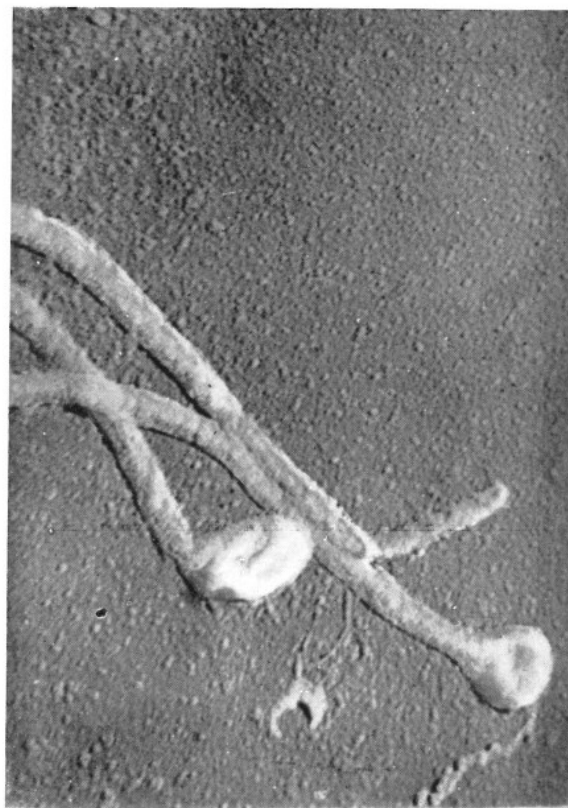


Fig. 4. - Filamenti in gemmazione.

Tutte le figure, tranne quella N. 1, sono ingrandite circa 18.000 $\times$ (microscopia elettronica). Quelle N. 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 e 16 sono state metallizzate con vapori di cromo.

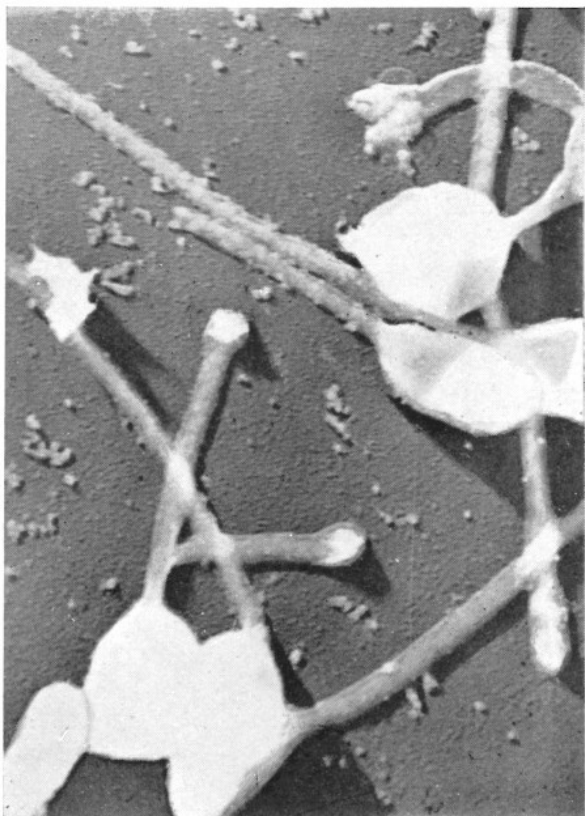


Fig. 5. - *H. vulgare* adulti e filamenti in gemmazione. Ramificazione di un filamento.

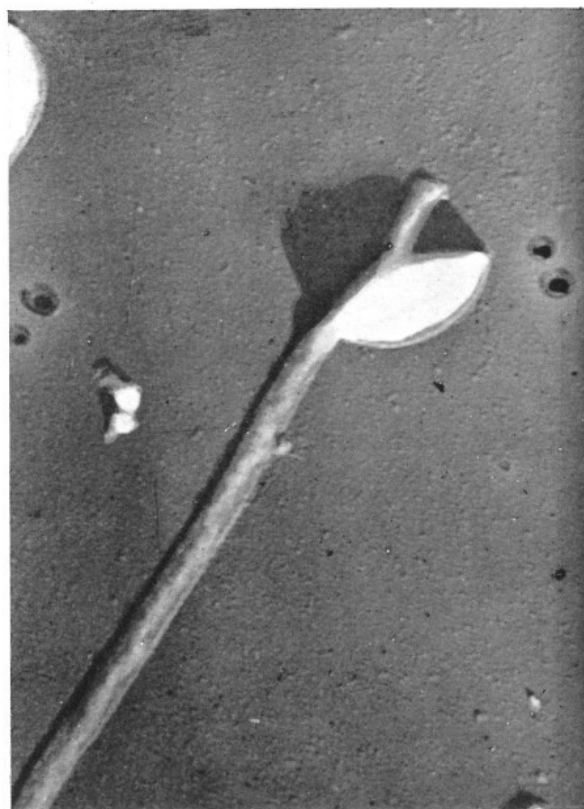


Fig. 6. - Cellula di *H. vulgare* a posizione intermedia.

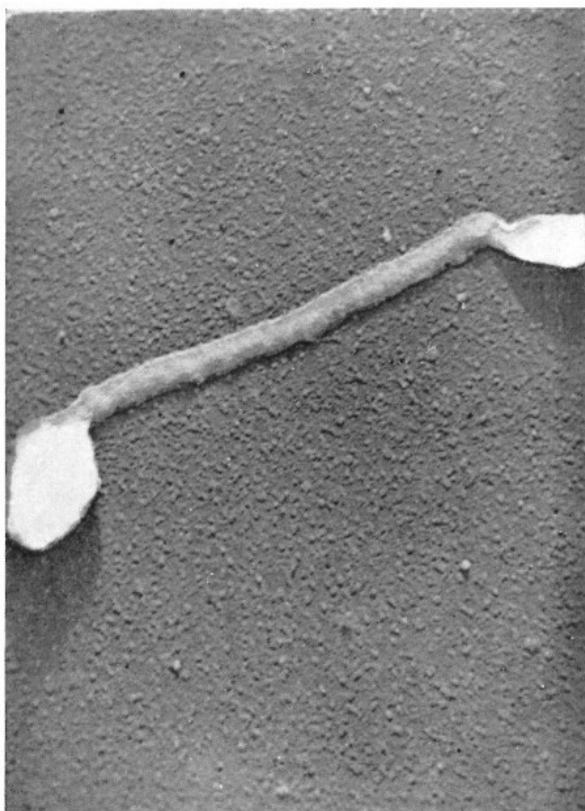


Fig. 7. - Cellula madre e cellula figlia di *H. vulgare*.



Fig. 8. - Cellule adulte di *H. vulgare*.



Fig. 9. - Cellule adulte di *H. vulgare* a protoplasma diafano. Elemento flagellato (in alto).

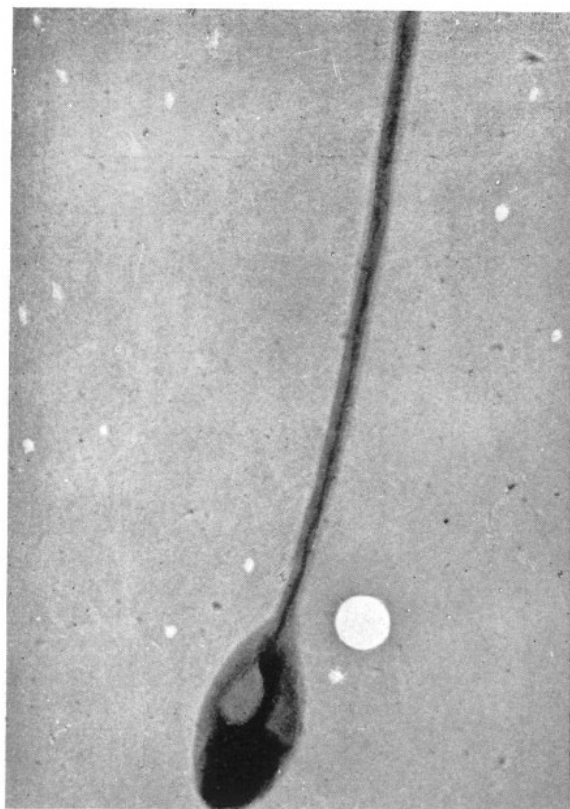


Fig. 10. - Cellula adulta di *H. vulgare*.



Fig. 11. - Elemento flagellato di *H. vulgare*.

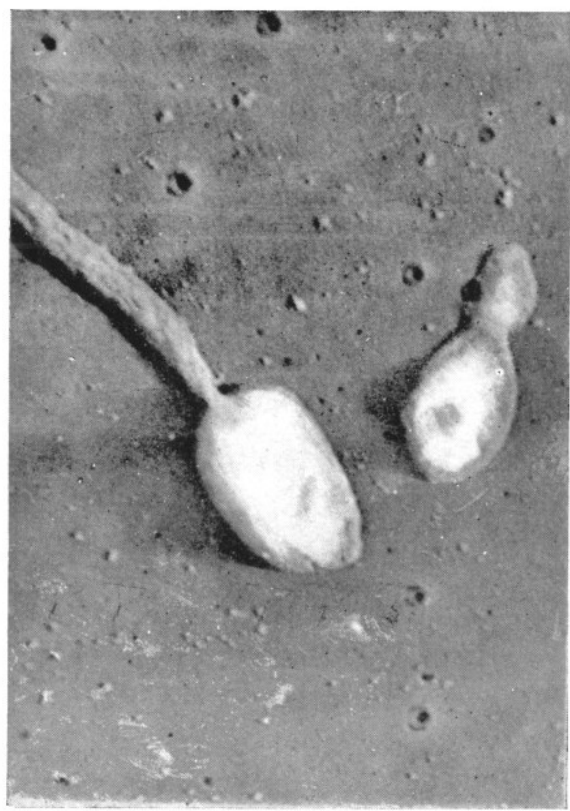


Fig. 12. - Cellula adulta in procinto di staccarsi dal filamento e cellula in procinto di emettere il filamento.

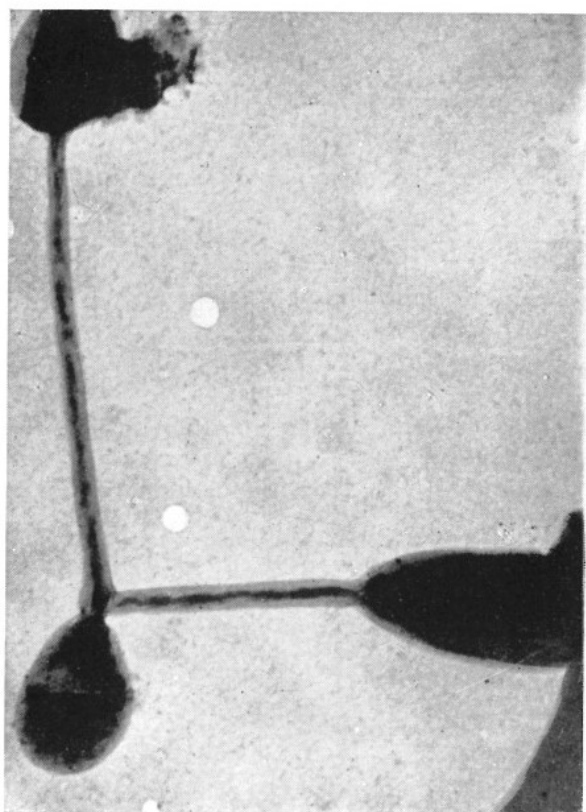


Fig. 13. - Forme mostruose di *H. vulgare* in vecchie culture in acqua peptonata.

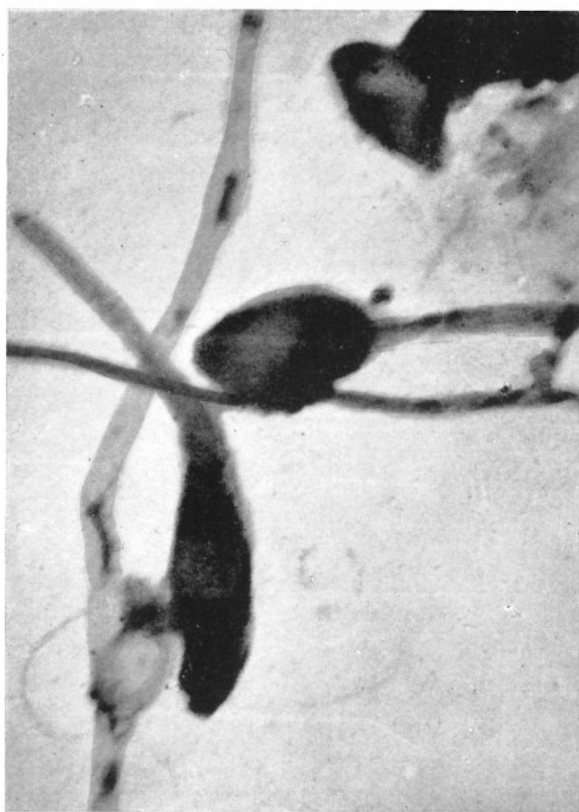


Fig. 14. - Forme mostruose di *H. vulgare* in vecchie culture in acqua peptonata.



Fig. 15. - Forme mostruose di *H. vulgare* in vecchie culture in acqua peptonata.



Fig. 16. - Forme mostruose di *H. vulgare* in vecchie culture in acqua peptonata.

tando da questa una goccia prelevata alla superficie, riuscii ad ottenere una cultura pura di leptospire, che attraverso a tutti i trapianti successivi si dimostrò priva delle forme in questione.

L'aggiunta di siero anti-canicola provoca un'evidente agglutinazione e lisi delle leptospire, mentre lascia del tutto immodificate le « S-Formen ».

Tutte queste ricerche confermano che l'organismo in questione non ha nulla a che fare con le leptospire e che esso rappresenta un accidentale inquinamento della cultura. E' probabile che esso si trovasse in origine nell'acqua di fonte distillata usata per la preparazione del terreno di cultura e che, avendosi sterilizzato questo non con il calore, ma semplicemente con la filtrazione, esso sia riuscito ad attraversare il filtro.

Isolato il microorganismo in cultura pura, ne ho studiato le caratteristiche biologiche.

Come ho detto, esso è capace di passare, per quanto non costantemente, i filtri di Seitz (E. K.); è resistente all'essiccamento se protratto per pochi minuti; muore invece se questo è prolungato per 3 giorni, resiste fino a 1 U. O. di penicillina per cc, mentre è inibito da 5 U. O. Cresce ugualmente bene in condizioni di aerobiosi o di anaerobiosi, e si sviluppa tanto a temperatura ambiente che a 37°. Quest'ultima è però la sua temperatura ottimale. Il suo sviluppo non è influenzato nè dalla presenza, nè dall'assenza di luce.

Non cresce, come osservato da JAKOB, nè in brodo, nè in agar: si sviluppa invece molto bene, e molto più abbondantemente che in terreno di Korthof, nell'acqua peptonata, intorbidandola lievemente e in modo uniforme. Cresce pure su agar-peptone, dando una patina sottile, uniforme, umida, bianchiccia. Non cresce su agar-sangue, agar-siero, brodo glucosato o lattosato, terreno di Petragnani, terreno di Sabouraud, terreno di Loeffler, terreno di Zuelzer. L'aggiunta di 1 mgr di acido nicotinico per l, di terreno di Korthof, favorisce il suo sviluppo.

Cresce bene, per quanto un po' meno abbondante che nell'acqua peptonata, nel terreno proposto da VAN NIEL (3) per i germi fotoeterotrofici:

NaHCO ₃	gr, 0,5	
NaCl	gr. 0,2	
(NH ₄) ₂ SO ₄	gr. 0,1	
K ₂ HPO ₄	gr. 0,05	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	gr. 0,01	
Na . S . 9H ₂ O	gr. 0,01	
etanolo	gr. 0,2	
H ₂ O	cc. 100	pH = 7

Lo stesso fa nei due seguenti terreni usati da KINGMA BOLTJES (4) per la cultura di *Hyphomicrobium vulgare*.

I:	acqua di fonte	cc. 100
	potassio nitrato	gr. 0,2
	fosfato bisodico	gr. 0,2
II ;	Na_2HPO_4	gr. 0,1
	NaCl	gr. 0,05
	MgSO_4	gr. 0,05
	FeSO_4	gr. 0,001
	KCl	gr. 0,001
	Na formiato	gr. 0,1
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	gr. 0,2
	H_2O	cc. 100

In questi due ultimi terreni si riscontra una forte percentuale di corpiccioli privi di filamento. Nell'acqua peptonata invece s'osservano alle volte forme mostruose, più grosse o più lunghe della norma, con filamenti ingrossati e bitorzoluti: forme che ricordano le cosiddette Pettenkoferie (figg. 13-16).

Nei terreni di cultura non si ha mai formazione di pigmento.

Con l'uso dei terreni di cultura qui sopra elencati, è pure possibile separare il microorganismo dalle leptospire.

La capacità che il microorganismo ha di svilupparsi nei terreni di Kingma Boltjes indica che si tratta di un organismo saprofita oligotrofico. La sua incapacità di svilupparsi in brodo, mentre riesce a crescere nell'acqua peptonata, fa ritenere che, secondo ogni probabilità, nell'estratto di carne sia contenuta una sostanza che ne inibisce la crescita.

Ho eseguito con il microbo in questione alcune prove di patogenicità, che hanno dato risultati del tutto negativi. Il microorganismo, inoculato sottocute o in peritoneo a topi, cavie, conigli, cuccioli, non ha mai determinato alcun sintomo morboso locale o generale. E' del pari riuscito impossibile coltivarlo dal sangue degli animali con esso inoculati.

Descritto così il microorganismo in esame e dimostrata la sua indipendenza dalle leptospire, resta da discuterne la posizione sistematica e le sue affinità con altri microorganismi precedentemente descritti.

Occorre in primo luogo eliminare qui il gruppo dei germi appartenenti alla famiglia delle *Caulobacteriaceae* (5), saprofiti frequenti nelle raccolte d'acqua, caratterizzati dalla proprietà di fabbricare una sorta di sottili gambi mediante i quali essi si fissano alla superficie degli oggetti immersi.

Per quanto tali germi presentino una superficiale somiglianza con quello da me studiato, ne differiscono principalmente perchè in essi il gambo è costituito da materia di secrezione, non vitale, mentre nel caso in questione il filamento è senz'altro vitale, come lo dimostra la sua capacità di sviluppare gemme, e deve quindi essere considerato un vero prolungamento protoplasmatico. Accenno a questa differenza che è fondamentale, trascurandone molte altre che pure avrebbero un notevole peso.

Maggiori affinità dimostra invece il microorganismo da me studiato con il microbio recentemente descritto da E. DUCHOW e H. C. DOUGLAS (6) sotto il nome di *Rhodomicrobium vannielii*. Anche questo microorganismo si presenta sotto forma di corpiccioli ovali, da cui partono sottili filamenti capaci di dare sviluppo alle loro estremità, ad altri corpiccioli simili. Si tratta certamente, nel mio caso e in quello di DUCHOW e DOUGLAS, di due microorganismi molto affini, non però identici. Le diversità infatti consistono nel fatto che mentre in *R. vannielii* i filamenti partono contemporaneamente da ambedue i poli della cellula, nel microorganismo da me studiato essi originano costantemente da uno solo dei due poli. Inoltre nel primo microorganismo i filamenti hanno grande tendenza a ramificarsi ripetutamente, mentre nel secondo le ramificazioni sono del tutto eccezionali. Il filamento di *R. vannielii* è inoltre spesso nettamente settato, il che non accade nel mio organismo. Anche le dimensioni di *R. vannielii* sono maggiori circa il doppio.

Nell'osservazione elettromicroscopica si nota una differenza fra i vacuoli rotondeggianti di *R. vannielii* e le zone opache a delimitazione trasversale del mio microorganismo.

Per quanto riguarda le differenze biologiche noteremo che il microorganismo di DUCHOW e DOUGLAS cresce solo in anaerobiosi e in presenza di luce, condizioni queste non necessarie a quello mio. Quest'ultimo inoltre non produce pigmento, mentre il microbo di DUCHOW e DOUGLAS dà un pigmento rosso tanto caratteristico da farlo annoverare dagli AA. che lo hanno studiato, fra i Purpurobatteri. Un'altra differenza è costituita dalla motilità del mio germe, per lo meno in uno stadio del suo sviluppo, motilità che sembra invece mancare nel microorganismo di DUCHOW e DOUGLAS. A questo carattere differenziale non si deve però dare un'importanza eccessiva perchè, data la rarità delle forme flagellate mobili, non è impossibile che esse siano sfuggite ai due AA. americani.

Le differenze sopra esposte sono certamente tali da permettere di distinguere nettamente i due germi, per quanto essi siano simili nella loro morfologia e nella modalità di riproduzione.

Affinità molto maggiori esistono invece fra il microorganismo studiato e *Hyphomicrobium vulgare* Stutzer e Hartleb, descritto per la prima volta da RULLMANN (7), nel corso di alcune ricerche sui germi nitrifi-

canti, e da questi denominato erroneamente, come più tardi da lui stesso riconosciuto (8), « *Nitrosobacterium formae novae* ». Tale germe fu ritrovato successivamente da STUTZER e HARTLEB (9, 10), che per primi riuscirono ad isolarlo da culture impure di *Nitrobacter*. In seguito *Hyphomicrobium vulgare* fu rivisto, sempre in culture di germi nitrificanti, da JOSHI (11), da FRED e DAVENPORT (12), tutti AA. che lo ritennero un particolare aspetto morfologico di *Nitrobacter* e non già un organismo autonomo. PROUTY (13) invece ne riconobbe l'autonomia e riuscì ad ottenerlo in cultura pura. E' probabile che anche GIBBS (14) l'abbia visto nelle sue culture di nitrobatteri.

Lo studio più completo e preciso di tale organismo è però dovuto a KINGMA BOLTJES (4), che lo isolò, con discreta frequenza, dall'acqua gocciolante da rubinetti in disuso, seminata in agar-nitrati.

Poichè quest'A. non l'ha studiato con il microscopio elettronico, non è facile decidere se esso corrisponda perfettamente a quello da me osservato, però l'identità dei due microorganismi è molto probabile. Infatti anche *Hyphomicrobium* è costituito da corpiccioli ovali, alle volte mobili e provvisti di flagello, i quali successivamente emettono un filamento più o meno lungo, che raramente può ramificarsi, e che dà origine, all'estremità libera, alla comparsa di una gemma che sempre più ingrossa fino a raggiungere le dimensioni della cellula madre. L'A. ha potuto osservare che il corpicciolo così formatosi ad un certo momento si stacca dal filamento, e che al suo posto può formarsi una nuova gemma e così via di seguito. Anche le dimensioni dei corpiccioli press'a poco corrispondono, mentre sulla minuta morfologia del germe studiato da Kingma Boltjes non abbiamo dati precisi, date le sue ridotte dimensioni.

Un altro carattere che fa ritenere che i due microorganismi siano identici, è quello della capacità che essi hanno di svilupparsi in un terreno povero come è quello costituito da acqua, nitrato di potassio e fosfato bisodico, utilizzando come fonte di carbonio le tracce d'impurità organiche che possono trovarsi nell'acqua distillata, nei sali ad essa aggiunti o nell'aria sovrastante al terreno di cultura. Infine ho già detto che il mio microorganismo è capace di svilupparsi nell'acqua peptonata, ma non nel brodo. Così pure KINGMA BOLTJES coltivò *Hyphomicrobium vulgare* in acqua peptonata e STUTZER e HARTLEB non riuscirono a farlo sviluppare in brodo o su agar.

In conclusione, per quanto non lo si possa asserire con assoluta certezza, ritengo che con ogni probabilità il germe da me studiato non sia altro se non *Hyphomicrobium vulgare*.

Resta ora da considerare il problema della sua posizione sistematica. Ritengo che il nome di *Hyphomicrobium vulgare* STUTZER e HARTLEB gli

debba essere conservato perchè il nome precedentemente assegnatogli da RULLMANN — « *Nitrosobacterium formae novae* » — è manifestamente erroneo, non trattandosi nel caso di un nitrobatterio.

In quanto poi alla sua posizione nella sistematica dei microorganismi, è evidente che *Hyphomicrobium* manca della caratteristica fondamentale degli schizomiceti: quella della capacità di dividersi per scissione trasversale. La presenza di filamenti, talvolta ramificati e capaci di dare origine per gemmazione a nuovi elementi cellulari, tende a farlo assegnare alla sottosezione delle *Mycophytae*. In tal caso i corpiccioli ovali dovrebbero essere accostati ai conidi e i filamenti dovrebbero essere considerati ife non settate. Le caratteristiche morfologiche e culturali del germe e la presenza di forme mobili, tendono ad accostarlo alla classe delle *Phycomycetae*, per quanto, finchè in esso non siano state riconosciute con sicurezza forme sessuate, tale assegnazione non possa essere altro che dubitativa. Pur lasciando perciò impregiudicata l'assegnazione di tale germe ad una classe piuttosto che ad un'altra, ritengo che per esso si possa senz'altro creare, nella sottosezione delle *Mycophytae*, la famiglia delle *Hyphomicrobiaceae*.

Naturalmente tale famiglia dovrebbe comprendere anche *Rhodomicrobium vannieli*.

Le caratteristiche della nuova famiglia vanno definite come segue: Germi ovali o rotondeggianti, da cui partono filamenti non settati, alle volte ramificati. La riproduzione cellulare avviene per comparsa alla estremità libera di tali filamenti, di una gemma che ingrandisce sempre più e che infine si stacca. Tali gemme possono comparire anche nel tratto di filamento che unisce due cellule.

In uno stadio della loro vita i germi possono essere mobili, per presenza di un lungo e sottile flagello. Non c'è sporificazione; i germi sono Gram —. Essi possono o meno contenere batterioclorofilla. Possono produrre pigmenti. La specie tipo è *Hyphomicrobium vulgare*.

La famiglia delle *Hyphomicrobiaceae* comprende due generi: *Hyphomicrobium* e *Rhodomicrobium*. Caratteristica del primo genere è l'assenza di batterioclorofilla; caratteristica del secondo è la presenza di questa e quindi l'esistenza della fotoeterotrofia.

Le differenze morfologiche tra *Hyphomicrobium* e *Rhodomicrobium* non sarebbero forse tali da giustificare di per sè sole la coesistenza di due diversi generi, però la differenza nel loro metabolismo è tale che credo giustificata la loro distinzione.

Specie tipo del genere *Hyphomicrobium* è *H. vulgare*; le sue caratteristiche sono le seguenti: Morfologia e moltiplicazione proprie della famiglia. Le cellule mature misurano $1\mu \times 0,5-0,6\mu$. Esse sono mobili in uno stadio del loro sviluppo. I filamenti misurano circa $0,1\mu$ di diametro e sono

di rado ramificati. Partono da un polo solo. La crescita avviene in molti terreni, anche molto poveri; non in quelli che contengono estratto di carne. Nei terreni liquidi c'è un lieve intorbidamento uniforme, in quelli solidi colonie minute, umide, biancastre. Non c'è formazione di pigmento. Il germe è capace di utilizzare come sorgente di carbonio le tracce di sostanze organiche presenti nell'acqua distillata o nella colonna d'aria sovrastante il terreno di cultura. E' aerobio e anaerobio facoltativo. Passa per i filtri.

Specie tipo del genere *Rhodomicrobium* è *R. vannielii*; le sue caratteristiche sono le seguenti: Morfologia e moltiplicazione proprie della famiglia. Le cellule mature misurano $1,2 \times 2,8 \mu$. Sono immobili (?). I filamenti misurano circa $0,3 \mu$ di diametro e sono spesso e ripetutamente ramificati. Essi partono da ambedue i poli. La crescita avviene solo in culture anaerobie illuminate. Non utilizza solfuri, tiosolfato e zuccheri. Non liquefa la gelatina. Catalasi positiva. Nei mezzi liquidi forma fiocchi. Produce un pigmento che va dal rosso salmone al rosso arancio. Le colonie sono rosso cupo, irregolari, a superficie rugosa.

Il reperto di due microorganismi così simili tra di loro come *B. vannielii* e *H. vulgare*, ma dei quali il primo è dotato di metabolismo fotosintetico, mentre il secondo ne è privo, crea un interessante problema tassonomico. E' infatti noto che il sottordine delle *Rhodobacterinae* Breed, Murray e Hitchens comprende tutti i germi che sono provvisti di un sistema di pigmenti costituiti dalla batterioclorofilla o da altre sostanze carotenoidi, capaci di dare ai germi un metabolismo fotosintetico che in un certo senso li accosta alle piante superiori, per quanto da queste ne differiscano per non liberare ossigeno, e per esercitare il loro metabolismo in quanto che nel terreno esistano composti ossidabili che vengono deidrogenati con contemporanea riduzione di biossido di carbonio. Questi germi, detti anche batteri purpurei, sono morfologicamente molto diversi tra di loro, come lo rileva anche van NIEL (3) che li ha profondamente studiati, ma il criterio della fotoeterotrofia è sembrata a questo A. abbastanza importante per tenerli distinti dagli altri gruppi e per raccogliervi in un sottordine a sé. In questo sottordine è compresa la famiglia delle *Athiorhodaceae*, che raggruppa i rodobatteri non contenenti granuli di zolfo e dotati di pigmento purpureo o bruno. A questa famiglia dovrebbe appartenere *Rhodomicrobium vannielii*.

Ma a parte il fatto che le caratteristiche morfologiche di questo germe lo fanno assegnare piuttosto agli ifomiceti che alle *Eubacteriales*, non pare logico che lo si possa staccare da *Hyphomicrobium vulgare* che, a parte il metabolismo, tanto gli assomiglia.

Vien fatto quindi di chiedersi se al criterio della fotoeterotrofia, indub-

biamente importante, possa essere attribuito un sì grande significato da considerarlo come elemento discriminativo decisivo fra due sottordini, o se non sarebbe più logico sopprimere il sottordine delle *Rhodobacterineae* e distribuire i germi in esso raggruppati fra i sottordini e le famiglie a cui apparterrebbero in base ai loro altri caratteri culturali e morfologici, creando per loro, in seno al sottordine e alla famiglia, soltanto un genere o tutt'al più, in certi casi, una famiglia speciale. Credo che la sistematica degli schizomiceti ne acquisterebbe in chiarezza. Naturalmente questo è un grosso problema che qui affaccio soltanto, augurandomi che studi e ricerche successive lo possano risolvere in un senso od in un altro.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Med. Klinik 42, 1, (1947).
 - 2) Klin. Wochenschr. 27, 364 (1949).
 - 3) Bact. Rev. 8, 1 (1944).
 - 4) Arch. f. Mikrob. 7, 188 (1936).
 - 5) J. of Bact. 30, 61 (1935).
 - 6) J. of Bact. 58, 409 (1949).
 - 7) C. f. Bakt. [2], 3, 229 (1897).
 - 8) C. f. Bakt. [2], 4, 152 (1898) e 5, 716 (1899).
 - 9) C. f. Bakt. [2], 3, 621 (1897) e 5, 678 (1899).
 - 10) Mitt. d. landwirtsch. Inst. kgl. Univ. Breslau 1, 75, 97 (1899).
 - 11) Mem. of the Dep. of Agric. in India 1, 86 (1915).
 - 12) Soil Sc. 11, 389 (1921).
 - 13) Soil Sc. 28, 125 (1929).
 - 14) Soil Sc. 8, 427 (1919).
-