

40. Giuseppe PENSO e Francesco SCANGA - Studi sul meccanismo di azione della streptomicina - Nota I: Alterazioni della *Escherichia coli*, in fase biotica e trattata colla streptomicina, osservata al microscopio elettronico.

L'azione della streptomicina sull'*Escherichia coli* viene da noi studiata sistematicamente sia dal punto di vista delle alterazioni morfologiche prodotte, sia dal punto di vista delle conseguenze biologiche derivate.

In questa prima nota riferiamo sulle alterazioni che dosi subinibenti di streptomicina hanno provocato sull'*Escherichia coli* in fase biotica, vale a dire su germi in via di sviluppo, mantenuti in terreno culturale e a temperatura di crescita.

Il ceppo di *Escherichia coli* da noi usato è un ceppo normale, conservato nella collezione dell'Istituto col n. 18, ceppo che resta inibito da una unità Waksman di streptomicina per centimetro cubo.

La tecnica praticata è stata la seguente: in provette contenenti 5 cm³ di brodo di carne a pH 7,2 si aggiungevano 2 unità di streptomicina (0,40 U. Waksman/cm³) e quindi un'ansata di brodocultura di 18 ore di *Escherichia coli*.

Il materiale da osservare al microscopio elettronico veniva così ottenuto:

1°) La brodocultura, dopo il tempo voluto, veniva centrifugata a 1500 giri al minuto per 20'.

2°) Il sedimento veniva trattato con 5 cm³ di una soluzione di formalina al 10%, agitato e centrifugato a 1500 giri per 20'.

3°) Il sedimento veniva raccolto con 5 cm³ di acqua bidistillata, agitato e centrifugato per 20' a 1500 giri.

4°) Il sedimento veniva raccolto con 5 cm³ di acqua bidistillata agitato e centrifugato per 20' a 1500 giri.

5°) Il sedimento veniva raccolto con circa 1 cm³ di acqua bidistillata e agitato; la sospensione era pronta per essere osservata al microscopio elettronico.

(*) La presente nota è stata presentata all'Accademia Nazionale dei Lincei nella seduta del 10 maggio 1947.

Come controllo veniva usata, con la stessa tecnica, una uguale cultura di *Escherichia coli* senza aggiunta di streptomicina.

Ed ora passiamo a considerare le conseguenze che una tale metodologia provoca sui germi.

A) Le culture di *E. coli* di due ore (senza aggiunta di streptomicina) mostrano, al microscopio elettronico, individui allungati, a margini netti, a protoplasma compatto, omogeneo, non trasparente; appena accennata, talvolta, la membrana pericellulare ed esclusivamente in vicinanza dei poli (fig. 1).

Non si tiene conto in questa descrizione, nè nelle successive, della presenza o meno di ciglia, in quanto le ripetute centrifugazioni sono deleterie per queste delicatissime appendici.

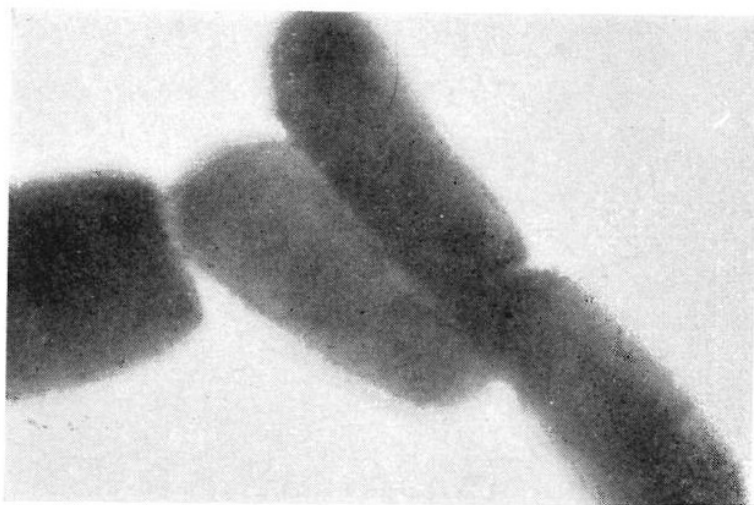
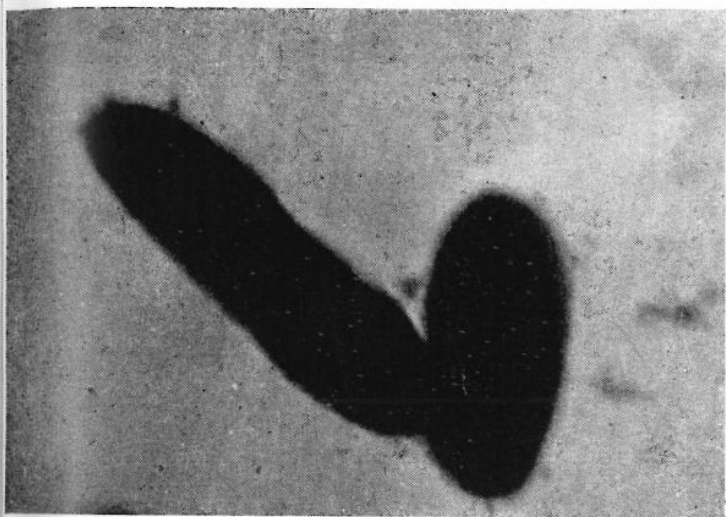
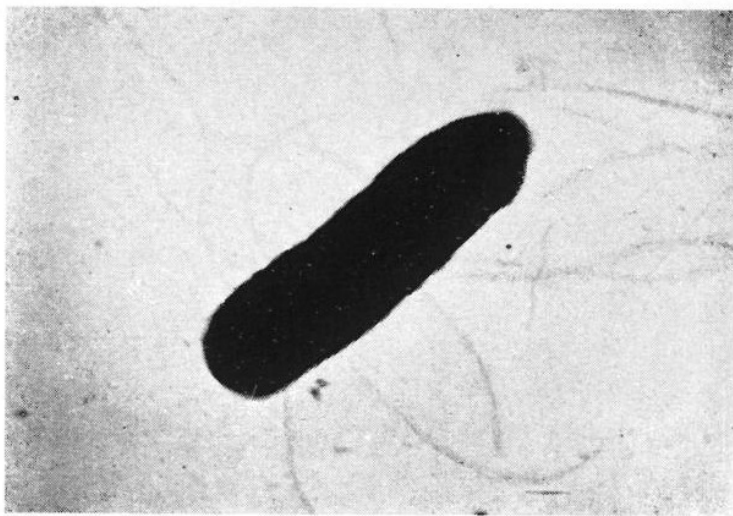
I coli di uguale anzianità, ma trattati con dosi subinibenti di streptomicina, si presentano di dimensioni pressochè analoghe ai controlli, ma leggermente rigonfi, con protoplasma meno compatto, più trasparente, talvolta leggermente aereolato. La membrana pericellulare non è mai visibile, ed è logico sia così, dato il rigonfiamento interno del protoplasma (figg. 2 e 3).

B) Le culture di coli di quattro ore (senza streptomicina) mostrano, al microscopio elettronico, individui più corti di quelli di due ore e leggermente più larghi: di aspetto generale, quindi, lievemente più tozzo. I margini cellulari sono sempre netti, il protoplasma sempre compatto, omogeneo, non trasparente, la membrana pericellulare pressochè invisibile, e ciò può essere logico dato l'ingrossamento subito dal germe (fig. 4).

I coli di uguale anzianità, ma trattati con dosi subinibenti di streptomicina, mostrano dimensioni analoghe ai germi normali, sebbene sia possibile incontrare forme leggermente meno tozze e più allungate. Il protoplasma è nuovamente compatto, omogeneo, ma coartato e a limiti ondulati: la membrana pericellulare è, di conseguenza, visibile sia ai poli, dove sopravanza nettamente il protoplasma, sia lungo i margini laterali (figg. 5 e 6).

C) Le culture di coli di sei ore (senza streptomicina) mostrano, sempre al microscopio elettronico, individui ancora più corti e più tozzi di quelli osservati nelle culture di quattr'ore. Il protoplasma è sempre a margini netti, compatto, omogeneo, non tra-

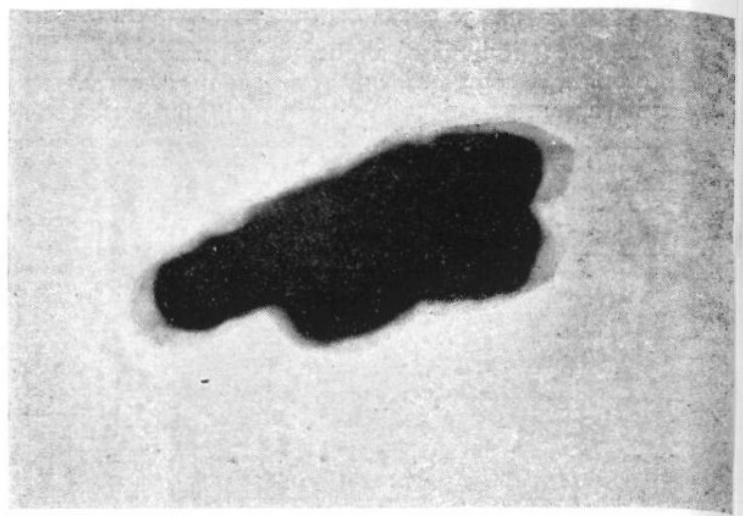
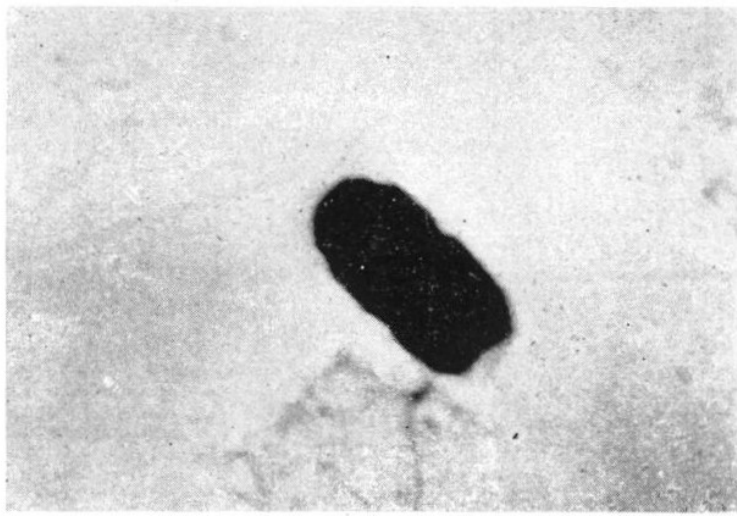
FIG. 1. — *Escherichia coli* da brodocultura normale di due ore: individuo allungato, a margini netti, a protoplasma compatto, omogeneo, non trasparente; appena accentuata ai poli la membrana perinucleare; ben visibili le ciglia.



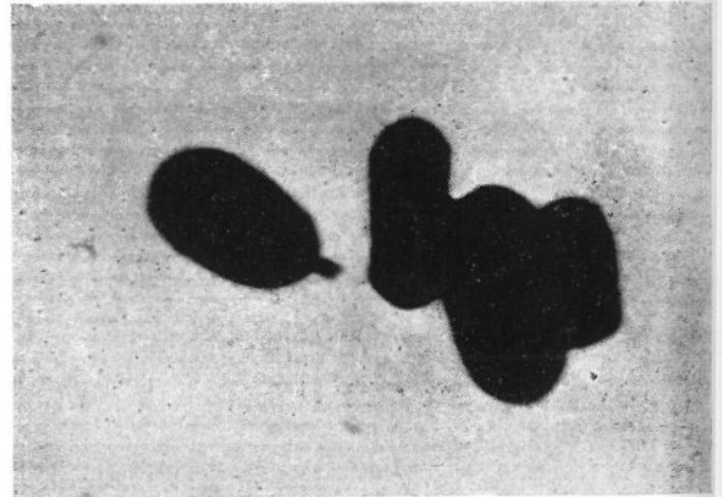
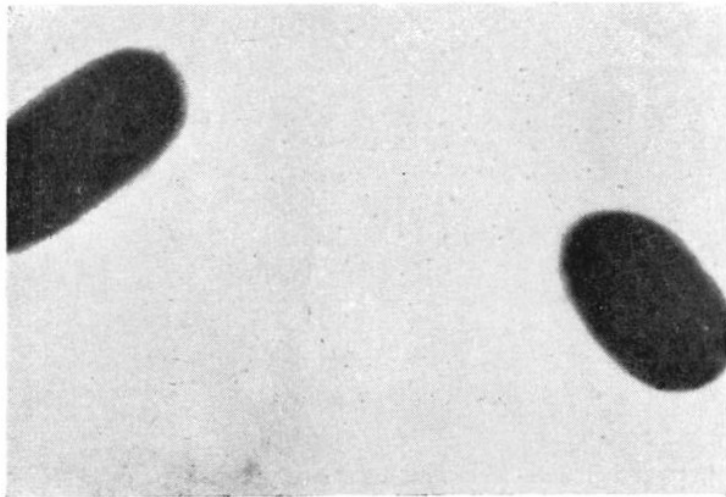
FIGG. 2 e 3. — *Escherichia coli* da brodo cultura in presenza di dosi subinibenti di streptomicina (dopo due ore): individui leggermente rigonfiati, con protoplasma poco compatto, trasparente in modico grado, qua e là qualche zona aereolata; la membrana pericellulare è invisibile.



FIG. 4. — *Escherichia coli* da brodocultura normale di quattro ore; individuo raccorciato, ingrossato, con protoplasma analogo a quel'o della Fig. 1; ben visibili le ciglia.



FIGG. 5 e 6. — *Escherichia coli* da brodocultura in presenza di dosi subinibenti di streptomicina (dopo quattro ore): individui con protoplasma compatto ma coartato, a limiti ondulati; la membrana pericellulare è nettamente visibile ai poli, dove sopravanza il protoplasma, e lungo i margini del germe; sono visibili alcune ciglia. (Paragonare questi germi con quelli delle Figg. 12, 16 e 24).



FIGG. 7. e 8. — *Escherichia coli* da brodocultura normale di sei ore: individui corti, tozzi, con protoplasma a margini netti, compatto, omogeneo, non trasparente; la membrana cellulare è pressochè invisibile.

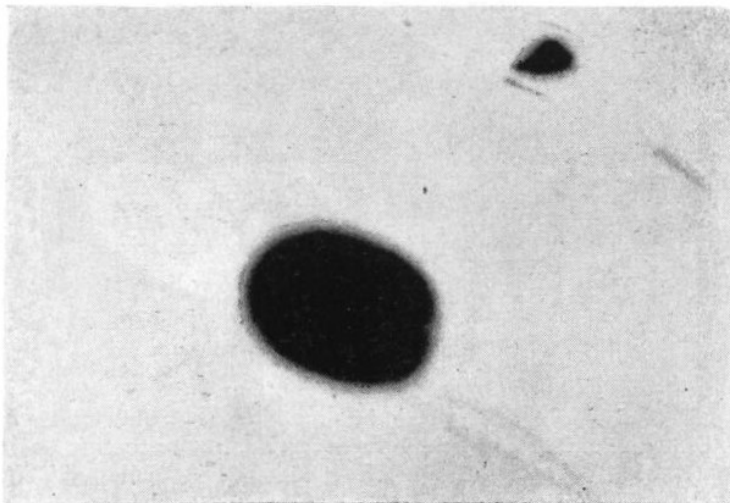


FIG. 9. — *Escherichia coli* da brodocultura in presenza di dosi subinibenti di streptomicina (dopo sei ore): individuo corto, tozzo, a barilotto, a margini sfumati, a protoplasma poco compatto, di aspetto torbido; visibili alcune ciglia.

FIG. 10. — *Escherichia coli* come alla Fig. 9: il primo e il terzo individuo in alto da destra analoghi a quello della Fig. 9, gli altri analoghi alla Fig. 11.

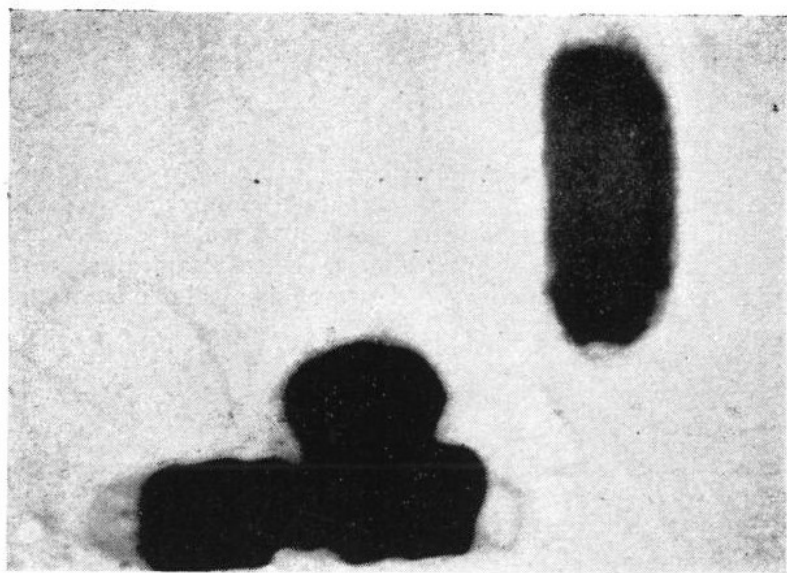
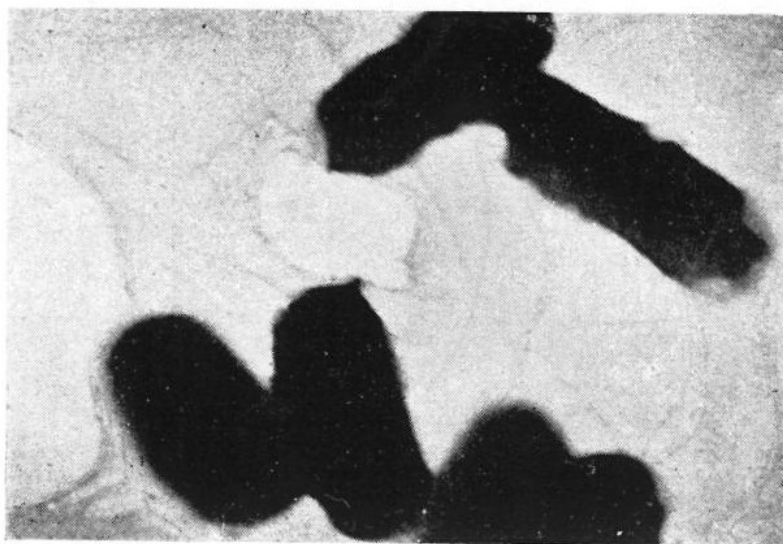
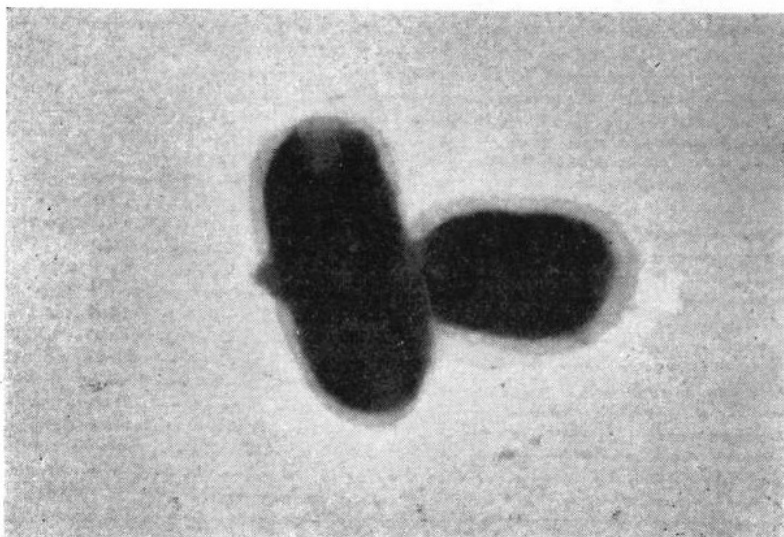
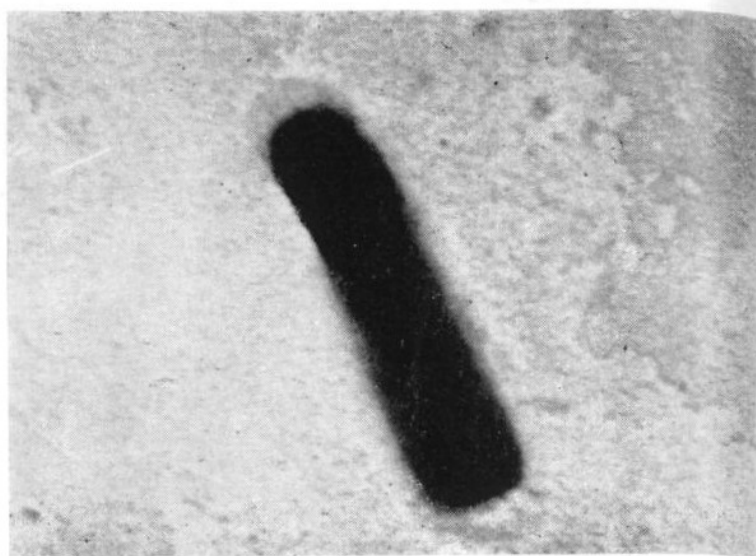
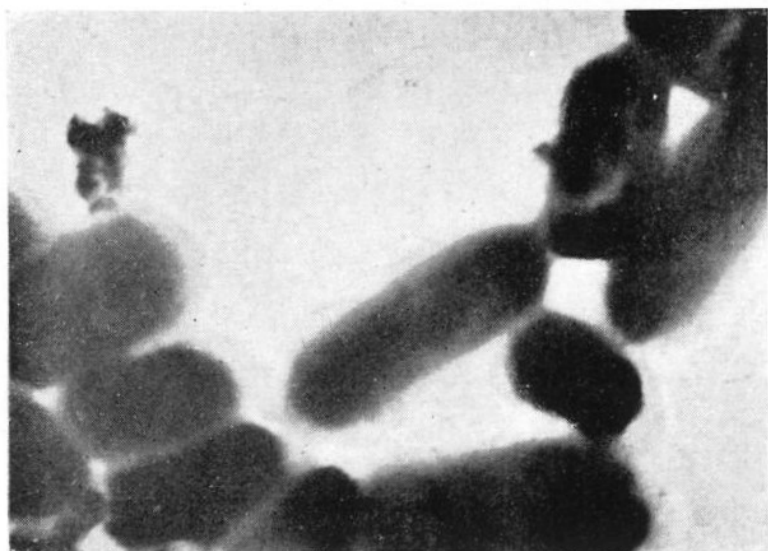


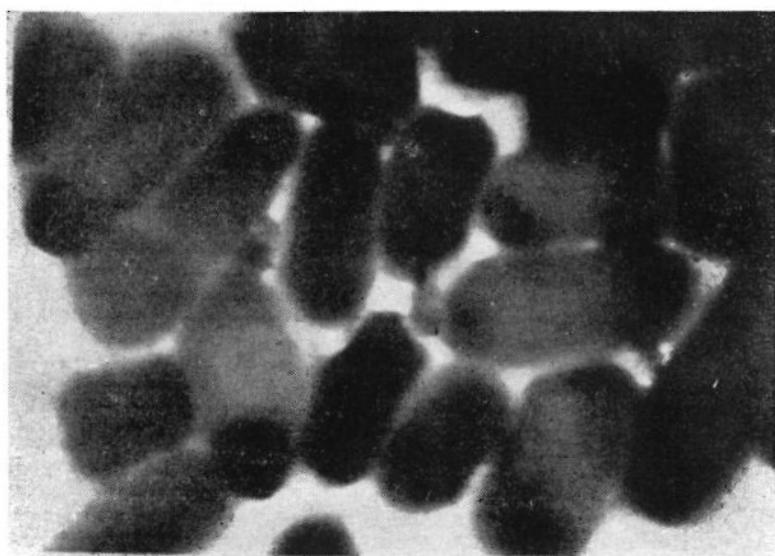
FIG. 11. — *Escherichia coli* come alla Fig. 9: individui corti e allungati, a protoplasma compatto, omogeneo, poco trasparente, malgrado siano osservabili alcune zone vacuolate, specialmente periferiche lungo i margini, dai quali si distacca la membrana pericellulare che sopravanza nettamente le regioni polari dei germi; ciglia ben visibili.

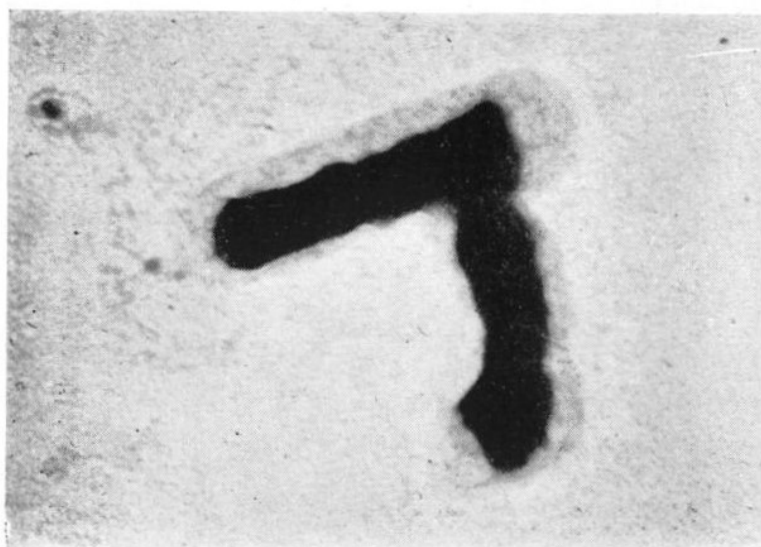
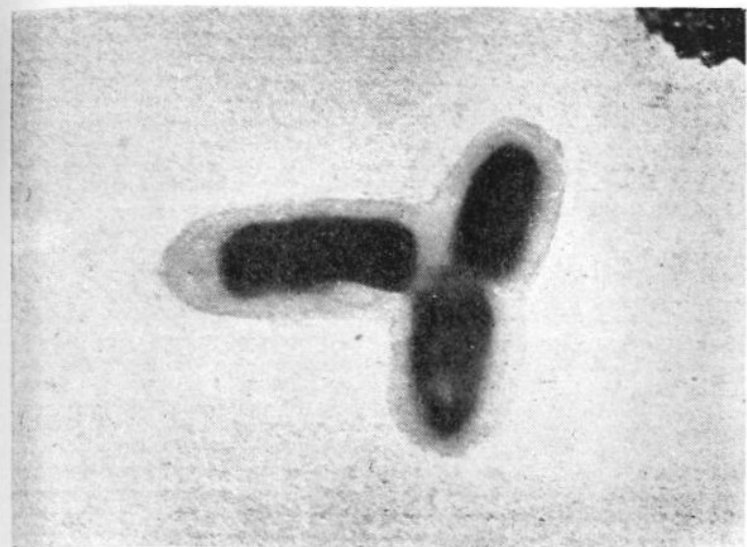
FIG. 12. — *Escherichia coli* da brodocultura normale di dodici ore: individui piuttosto tozzi, a margini netti, con protoplasma non omogeneamente compatto e con schiarimenti polari a semi-luna; membrana pericellulare nettamente distaccata dallo stroma protoplasmatico; ai poli alcuni sottilissimi filamenti congiungono il protoplasma con la membrana.



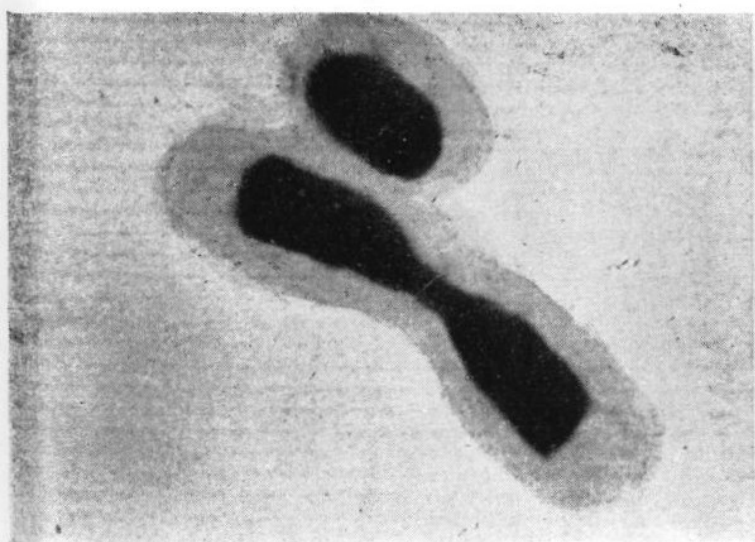


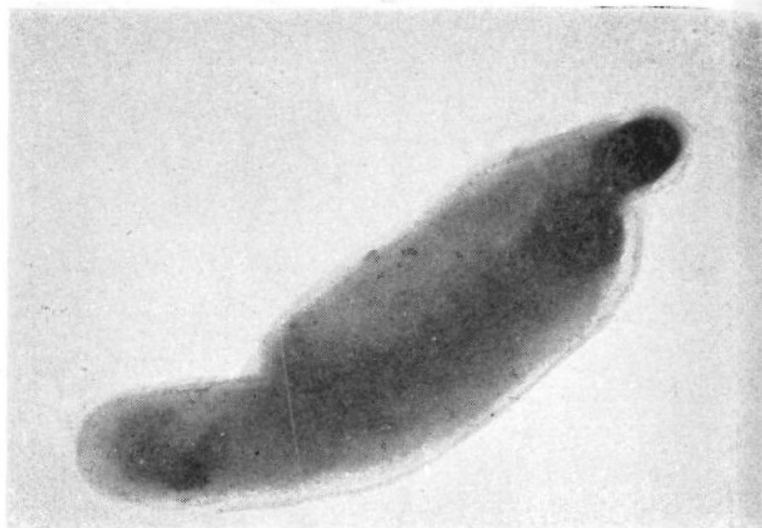
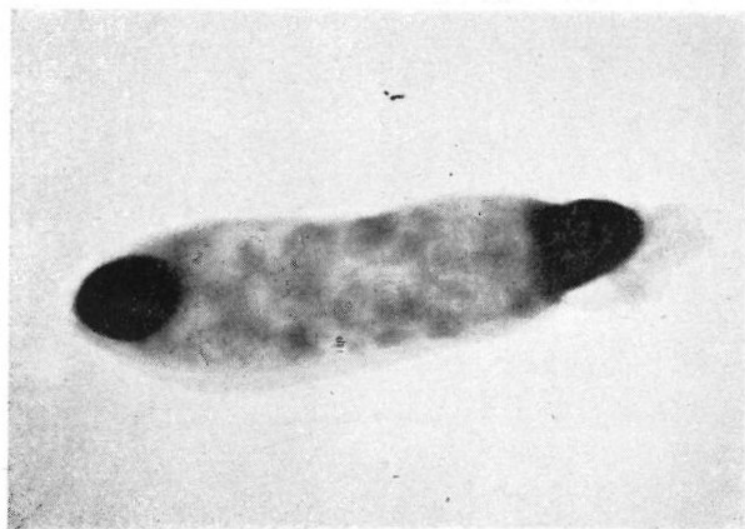
FIGG. 13, 14 e 15. — *Escherichia coli* da brodocultura in presenza di dosi subinibenti di Streptomina (dopo dodici ore): individui generalmente cori, con protoplasma non omogeneo nè uniforme, ma con schiarimenti centrali, e ispessimento verso le due estremità polari e, a volte, qua e là anche nello stroma protoplasmatico; la membrana pericellulare è distaccata; in alcuni esemplari (Fig. 15) si osservano nettamente le lacinie che uniscono il protoplasma alla membrana.



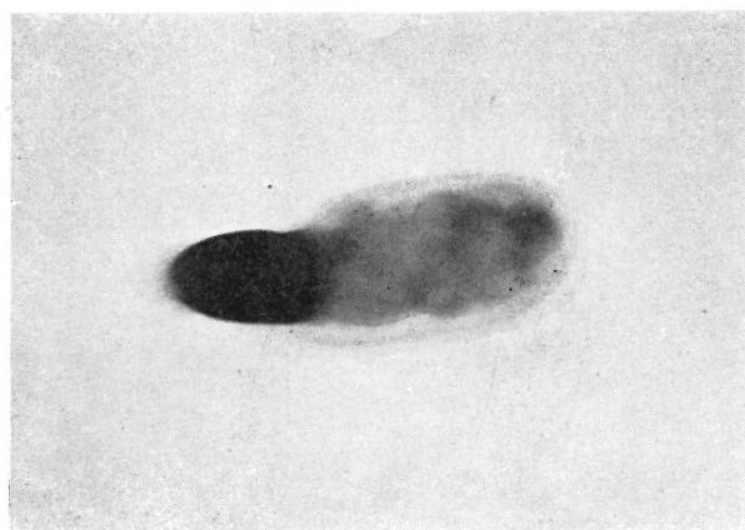


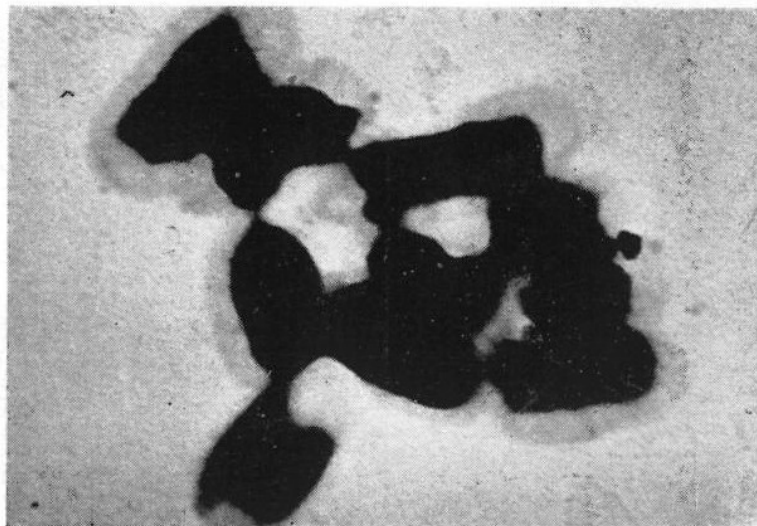
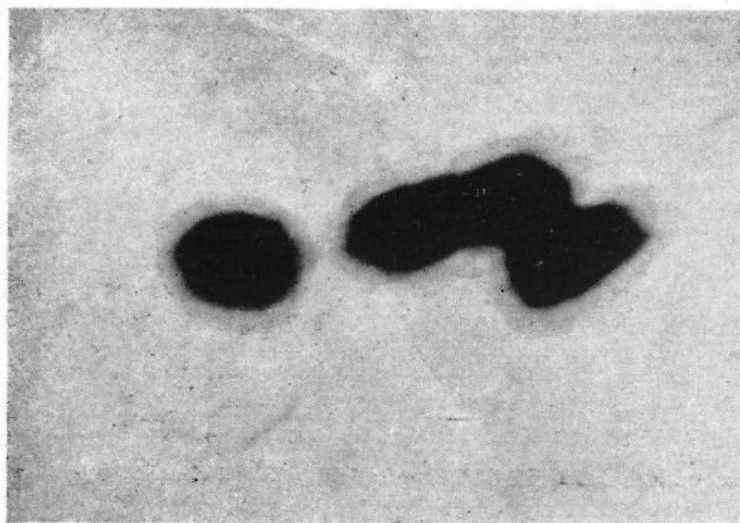
FIGG. 16, 17, 18 e 19. — *Escherichia coli* da brodocultura normale di ventiquattro ore: individui di dimensioni diverse con protoplasma non omogeneo, con ispessimenti irregolari irregolarmente diffusi nel corpo batterico i cui margini protoplasmatici sono irregolari e quasi seghettati; la membrana cellulare è distaccata, a volte non si vede (Fig. 19): nella Fig. 18 un individuo in divisione





FIGG. 20, 21, 22 e 23. — *Escherichia coli* da brodocultura in presenza di dosi subinibenti di streptomicina (dopo ventiquattro ore); individui con protoplasma diminuito di compattezza, trasparente al centro del corpo e con un netto addensamento agli estremi o a un estremo del germe; lo schiarimento interno è accompagnato dall'ingrossamento dello stroma protoplasmatico i cui margini debordano da quelli delle zone addensate; la membrana pericellulare è scarsamente visibile.





FIGG. 24 e 25. — *Escherichia coli* da brodocultura normale di quarantotto ore: individui di dimensioni varie, con protoplasma quartato, compatto e a margini più o meno ondulati; con membrana pericellulare sempre distaccata dal protoplasma in tutto il suo perimetro, salvo qualche sottilissima lacinia di raccordo.

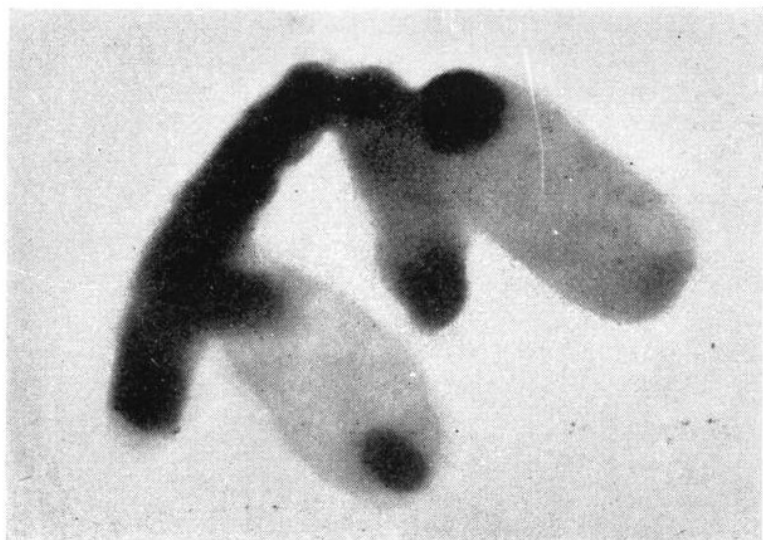
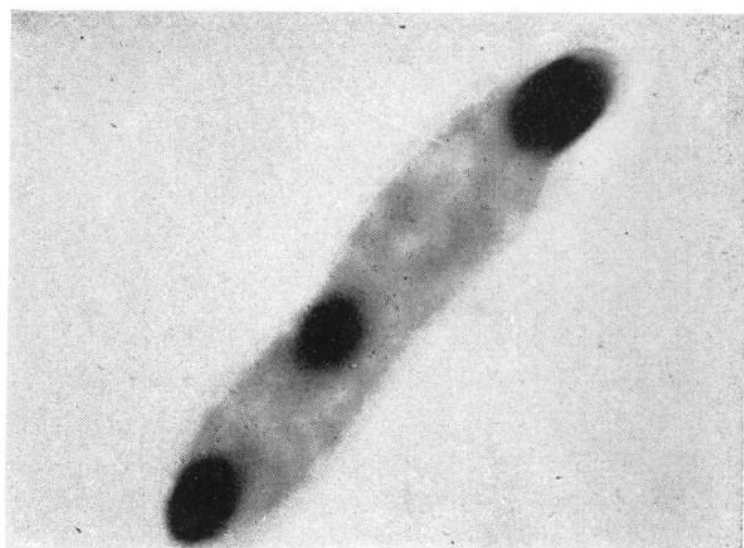
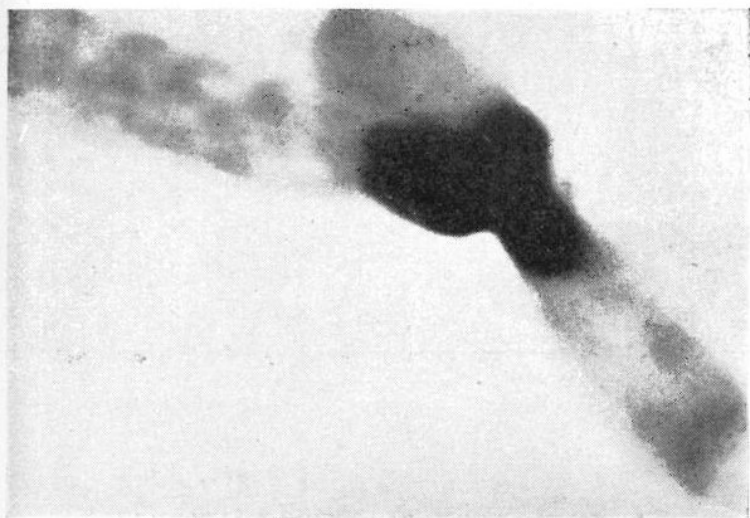


FIG. 26, 27 e 28. — *Echerichia coli* da brodocultura in presenza di dosi subinibenti di streptomicina (dopo quarantotto ore): individui allungati, con protoplasma notevolmente chiarificato e addensamento apicale notevolmente ridotto di volume e limitato a una piccola superficie ellittica immersa nella zona chiara, la quale si presenta (Fig. 28) sia uniforme, sia (Figg. 26 e 27) variegata con zone di maggiore o minore addensamento; la membrana pericellulare è talora visibile.

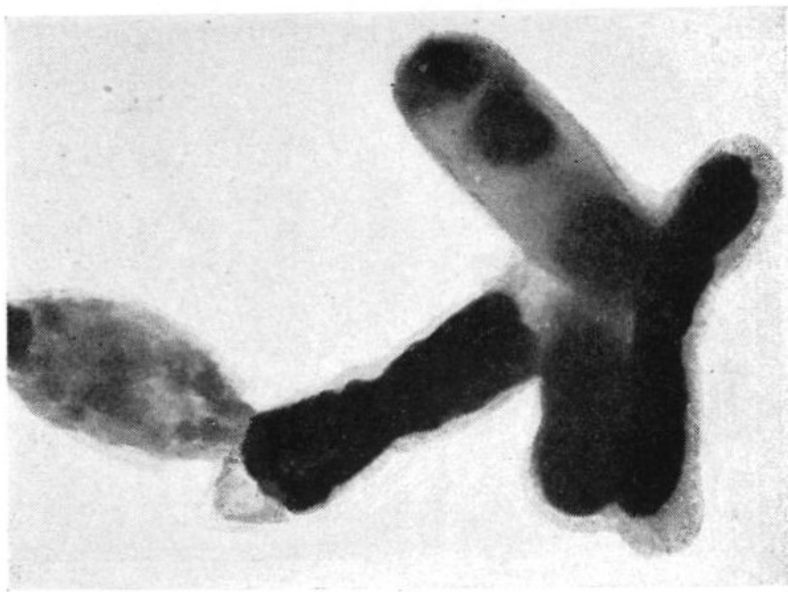
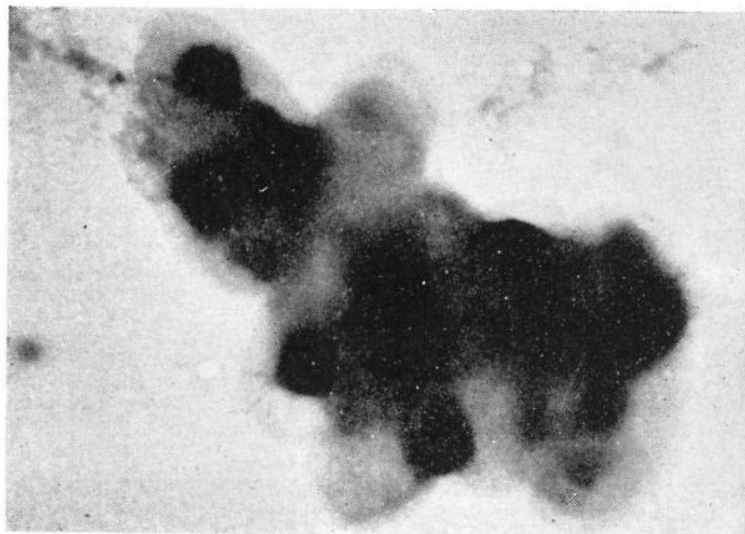
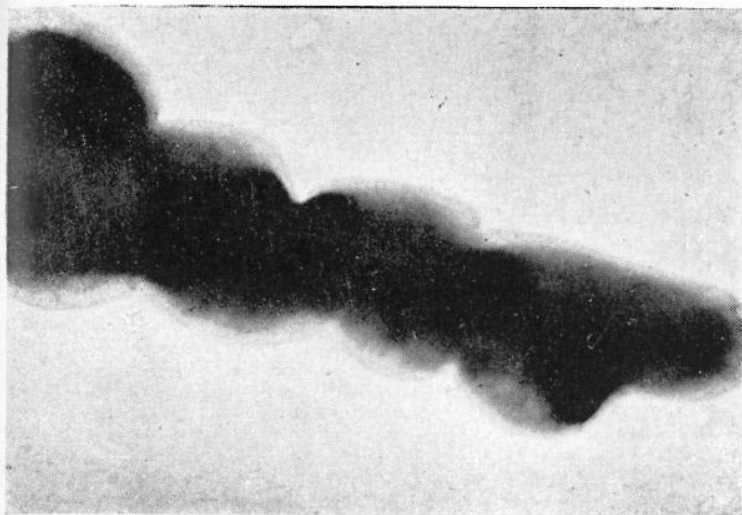


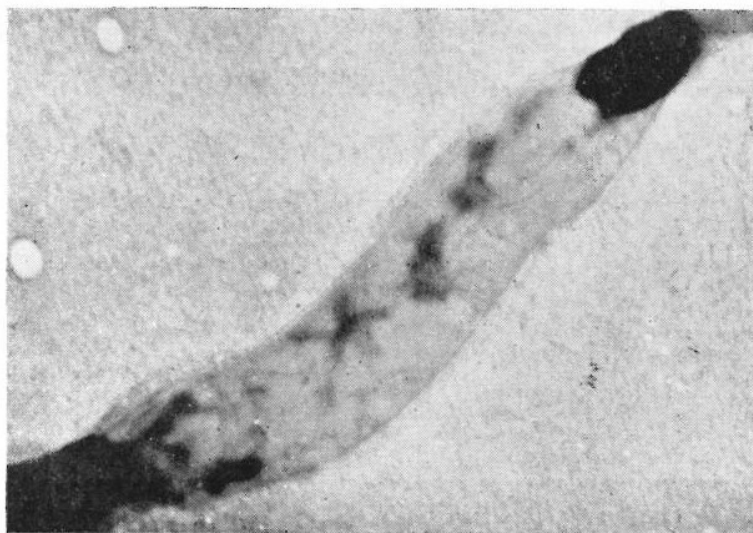
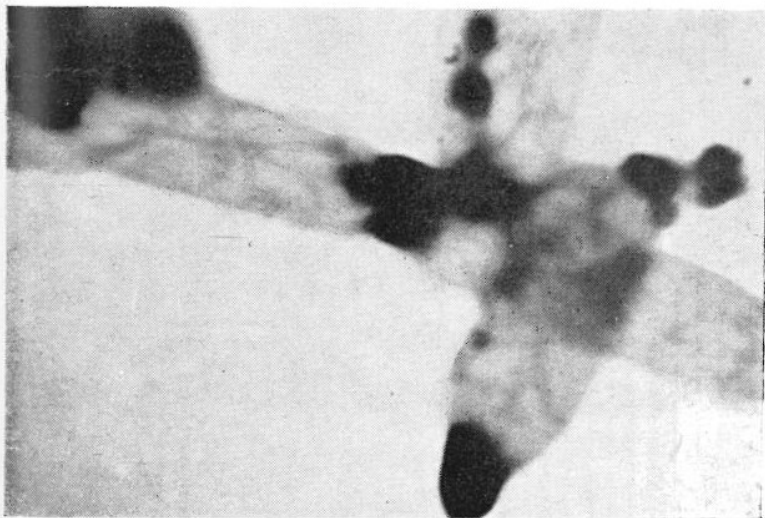
FIG. 29. — *Escherichia coli* da brodocultura normale di settantadue ore; individui di dimensioni varie, con protoplasma coartato di spessore disuguale, a volte chiarificato in gran parte e con residui addensamenti circolari; membrana pericellulare distaccata, salvo sottilissime lacinie che la raccordano al protoplasma centrale.



FIG. 30. — *Escherichia coli* come alla Fig. 29. Tre elementi di età diversa: uno giovane a protoplasma compatto, un secondo in cui incomincia la fase di invecchiamento, un terzo più vecchio a protoplasma chiarificato e con addensamenti circolari.



FIGG. 31 e 32. — *Escherichia coli* da brodocultura in presenza di dosi subinibenti di streptomicina (dopo settantadue ore): individui rigonfi, con addensamento protoplasmatico a margini indistinti e ridotti a una piccola isola; il resto del protoplasma è chiarificato seppure di aspetto torbido; la membrana pericellulare è distaccata e poco visibile.



FIGG. 33 e 34. — *Escherichia coli* come alla Fig. 31. Individui ingrossati e allungati; l'ingrossamento è a carico soprattutto della porzione del corpo in cui non vi è più protoplasma addensato, ma semplici trabecole irregolari, quasi che il protoplasma si sia idropizzato. Caratteristica la sfumatura esistente tra protoplasma ancora addensato e protoplasma chiarificato. La membrana pericellulare è pressochè invisibile: la si indovina ancora in qualche punto limitato di tre individui della Fig. 33.

sparente. La membrana pericellulare è pressochè invisibile (figure 7 e 8).

I coli di uguale anzianità, ma trattati con dosi subinibenti di streptomicina, mostrano individui tozzi, corti, a barilotto, a margini sfumati, a protoplasma meno compatto e meno omogeneo degli individui normali, diremo quasi ch'esso si presenta d'aspetto torbido e con addensamento maggiore al centro che alla periferia, dove la membrana pericellulare è rigonfia, male individuabile ma comprensibile. Accanto a simili organismi si rinvencono altri individui che hanno, invece, il protoplasma ancora compatto, omogeneo, poco trasparente, malgrado siano osservabili alcune zone vacuolate, specialmente periferiche e lungo i margini dai quali si distacca la membrana pericellulare che sopravanza nettamente le regioni polari dei batteri (figg. 9, 10 e 11).

D) Le culture di coli di dodici ore (senza streptomicina) mostrano, al microscopio elettronico, individui presso a poco analoghi, come dimensioni a quelli di sei ore; il protoplasma, però, non è omogeneamente compatto, ma presenta uno schiarimento polare a semiluna. La membrana pericellulare, poi, è nettamente distaccata da tutto il corpo protoplasmatico del germe, salvo nelle regioni polari dove alcuni sottilissimi filamenti congiungono il protoplasma con la membrana (fig. 12).

I coli di uguale anzianità, ma trattati con la streptomicina, presentano alterazioni nuove: il protoplasma ha generalmente margini sfumati, non si presenta omogeneo, nè uniforme; si notano, invece, ispessimenti caratteristici alle due estremità polari e, a volte, qua e là anche nello stroma protoplasmatico. Generalmente il centro del corpo batterico è più chiaro, e quindi meno spesso, del rimanente. La membrana pericellulare è distaccata. In alcuni esemplari si osservano nettamente le lacinie che uniscono il protoplasma alla membrana (figg. 13, 14 e 15).

E) Le culture di coli di 24 ore (senza streptomicina) presentano individui di diverse dimensioni e caratterizzati dal fatto di avere il protoplasma non omogeneo, non compatto, con ispessimenti irregolarmente diffusi in tutto il corpo batterico, i cui margini protoplasmatici sono irregolari e quasi seghettati. La membrana pericellulare è completamente distaccata dal corpo batterico; a volte

essa non si vede, l'aspetto del protoplasma conserva, però, le sue caratteristiche (figg. 16, 17, 18 e 19).

I coli di uguale anzianità, ma trattati con dosi subinibenti di streptomicina, presentano alterazioni tipiche che sono una chiara evoluzione delle alterazioni osservate dopo 12 ore. Il protoplasma batterico diminuisce di compattezza, divenendo più trasparente al centro del corpo, mentre si ha un netto addensamento protoplasmatico agli estremi del germe. Lo schieramento interno è accompagnato da un ingrossamento dello stroma protoplasmatico, i cui margini debordano da quelli delle estremità, per cui tra gli estremi distali e il centro del germe si viene ad avere un vero scalino. A volte s'incontrano germi la cui alterazione protoplasmatica ha colpito anche una estremità del germe stesso, per cui tali organismi si presentano con un solo estremo a protoplasma addensato. La membrana pericellulare è, di solito, scarsamente visibile; a volte s'indovina ed è staccata dal protoplasma (figg. 20, 21, 22 e 23).

F) Le culture di coli di quarantotto ore (senza streptomicina), mostrano individui di dimensioni varie, con protoplasma più o meno compatto e a margini più o meno ondulati, ma con membrana pericellulare sempre distaccata dal protoplasma in tutto il suo perimetro. La larghezza dello spazio tra la membrana e il protoplasma dice come questo abbia dovuto notevolmente coartarsi (figg. 24 e 25).

I coli di uguale anzianità, e trattati con dosi subinibenti di streptomicina, mostrano il corpo piuttosto allungato, il protoplasma notevolmente chiarificato, l'addensamento apicale, già descritto negli individui di 24 ore, notevolmente ridotto di volume e limitato talvolta a una piccola superficie ellittica immersa nella zona chiara, la quale si può presentare sia uniforme, sia variegata con zone di maggiore o minore addensamento; la membrana pericellulare ora visibile ed ora no (figg. 26, 27 e 28).

G) Le culture di coli di settantadue ore (senza streptomicina) mostrano individui di dimensioni varie e di aspetto spesso differente; accanto a microrganismi che ricordano le forme già descritte di 24 e 48 ore, si notano individui con protoplasma coartato o addensato, a margini sfumati e a membrana pericellulare rigonfia e di

aspetto torbido (figg. 29 e 30) e tali da ricordare coli più giovani trattati con la streptomicina.

I coli di uguale anzianità, e trattati con dosi subinibenti di streptomicina, mostrano il corpo notevolmente ingrandito sia nel senso della lunghezza che in quello della larghezza, il protoplasma si è talmente chiarificato da sembrare quasi inesistente, solo agli apici e nelle regioni subapicali — talvolta, in forme più tozze, nella regione centrale — si notano ammassi protoplasmatici più o meno spessi, a limiti quasi sempre irregolari, indistinti, degradanti verso il resto del protoplasma ridotto a un'ombra più o meno variegata e solcata da trabecole sottili (figg. 33 e 34).

Da queste prime osservazioni si può dedurre che l'*Escherichia coli*, mantenuta in brodocultura, evolve la sua *facies* strutturale nel senso che le forme giovani si presentano allungate, a protoplasma omogeneo, compatto, non trasparente, a membrana pericellulare invisibile; mano mano che le culture invecchiano, le forme dapprima si raccorciano e divengono più tozze, mantenendo invisibile la membrana pericellulare, poi si riallungano più o meno, coartando il protoplasma, e la membrana pericellulare diviene nettamente visibile e completamente distaccata dal corpo batterico.

L'*Escherichia coli*, coltivata in presenza di dosi subinibenti di streptomicina, evolve nel senso che dapprincipio i germi presentano un semplice rigonfiamento, seguito subito dal distacco della membrana pericellulare, e poi da uno schiarimento protoplasmatico centrale accompagnato da un rigonfiamento della zona chiara e da un addensamento apicale che va sempre più riducendosi; alla fine il germe presenta il corpo molto allungato, il protoplasma ridotto a un piccolo addensamento a limiti sfumati, mentre la membrana pericellulare sembra non contenere più nulla; in realtà deve esservi una parvenza di protoplasma rivelato da piccoli addensamenti irregolari, poco più che filiformi, visibili qua e là.

Il significato biologico di tali alterazioni verrà discusso in altra nota basandosi su nuovi dati sperimentali. Allo stato dei fatti possiamo concludere che l'*Escherichia coli*, coltivata in presenza di dosi subinibenti di streptomicina, subisce un invecchiamento precoce tale che dopo quattro ore si hanno forme analoghe a quelle che si rinvencono in culture normali di 12 e 24 ore.

Tale invecchiamento precoce sembra evolvere, però, differentemente dall'invecchiamento naturale (*).

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Batteriologia - Maggio 1947.

RIASSUNTO

Si descrivono le alterazioni — osservate al microscopio elettronico — subite dall'*Escherichia coli* trattata con dosi subinibenti di streptomina e dopo un contatto di 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 ore.

RÉSUMÉ

On décrit les altérations — observées au microscope électronique — subies par l'*Escherichia coli* lorsqu'elle est traitée avec des doses subinhibantes de streptomycine et après un contact de 2, 4, 6, 12, 24, 48 et 72 heures.

SUMMARY

A description is given of the alterations — observed with the electron microscope — undergone by *Escherichia coli* when treated with subinhibiting doses of streptomycin and after a contact of 2, 4, 6, 12, 24, 48 et 72 heures.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die, im Elektronenmikroskop betrachteten Veränderungen beschrieben, welche die *Escherichia coli* bei Behandlung mit schwach hemmenden Dosen Streptomycin unterliegt; Berührungsdauer von je 2, 4, 6, 12, 24, 48, und 72 Stunden.

(*) Ringraziamo la professoressa Daria Bocciarelli per la collaborazione prestataci durante l'osservazione al microscopio elettronico.