

41. Brenno BABUDIERI. — Un nuovo procedimento per l'allestimento di preparati batterici destinati all'osservazione col supermicroscopio elettronico.

Riassunto. — L'A. descrive una nuova tecnica per l'allestimento di preparati batterici destinati all'osservazione col microscopio elettronico. La tecnica consiste nell'allestire culture del germe in esame in una goccia di acqua distillata deposta sulla superficie di un foglietto di cellophane posato sull'agar di una piastra. Con questo procedimento si riesce a mettere in evidenza alcune delicate particolarità di struttura dei germi che l'abituale tecnica della centrifugazione ripetuta, per lo più altera.

Résumé. — L'A. décrit une nouvelle technique pour obtenir une préparation bactérienne destinée à être observée au microscope électronique. Cette technique consiste à préparer des cultures du germe en question dans une goutte d'eau distillée déposée sur la surface d'un feuillet de cellophane placé sur l'agar-agar d'une boîte de Petri. Ce procédé permet de faire ressortir quelques particularités délicates de la structure des germes, qui dans la technique usuelle de la centrifugation répétée sont le plus souvent altérées.

Summary. — The A. describes a new technique for obtaining bacterial preparations intended for examination with the electron microscope. This technique consists in preparing cultures of the germ under examination in a drop of distilled water deposited on the surface of a membrane of cellophane placed on the agar of a Petri dish. By this process it is possible to throw into relief some delicate features in the germ structure, which in most cases are subject to changes when the usual technique of repeated centrifugation is used.

Zusammenfassung. — V. beschreibt eine neue Technik zur Herstellung von bakteriologischen Präparate die zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vorbereitet werden. Die Technik besteht in der Herstellung von bakteriellen Kulturen in einem Tropfen destilliertes Wasser, auf der Oberfläche einer Zellophanmembrane die auf einer Agarplatte hingelegt wird.

Mit dieser Methode ist es gelungen, manche zarten bakteriellen Struktureinheiten, die durch die gewöhnliche wiederholte Zentrifugationsmethode beschädigt werden, zu beobachten.

Una delle maggiori difficoltà che s'incontrano nell'allestimento di preparati batterici per l'osservazione con il microscopio elettronico, consiste nel liberare i germi da ogni traccia di materiale eterogeneo, quali possono essere i componenti del terreno di cultura o i prodotti del metabolismo o del disfacimento dei germi stessi. Occorre cioè arrivare ad una sospensione di germi in pura acqua distillata.



FIG. 1. — *Proteus vulgaris*. Cilia

Questo scopo si ottiene abitualmente lavando i germi attraverso a ripetute contrifugazioni ed eliminando così dalla sospensione batterica tutte le sostanze eterogenee.

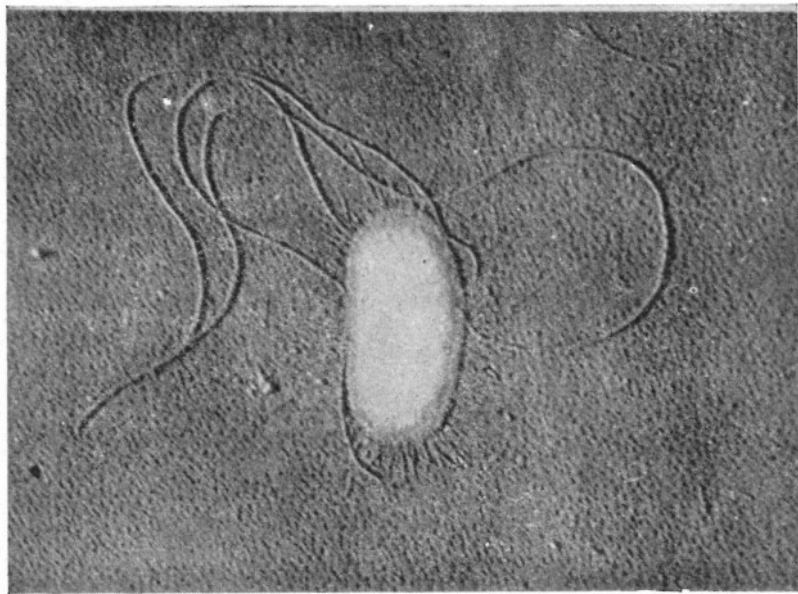


FIG. 2. — *Proteus vulgaris*. Cilia e raggiera

A parte però la perdita di tempo, questo procedimento non si può considerare del tutto innocuo per i germi. Le centrifugazioni ripetute, lo scuotimento necessario per riportare in sospensione il

sedimento centrifugato, costituiscono traumi meccanici che non restano

senza conseguenze per la integrità del germe, e specie per alcune sue delicate particolarità strutturali, quali le cilia, le raggere, ecc.

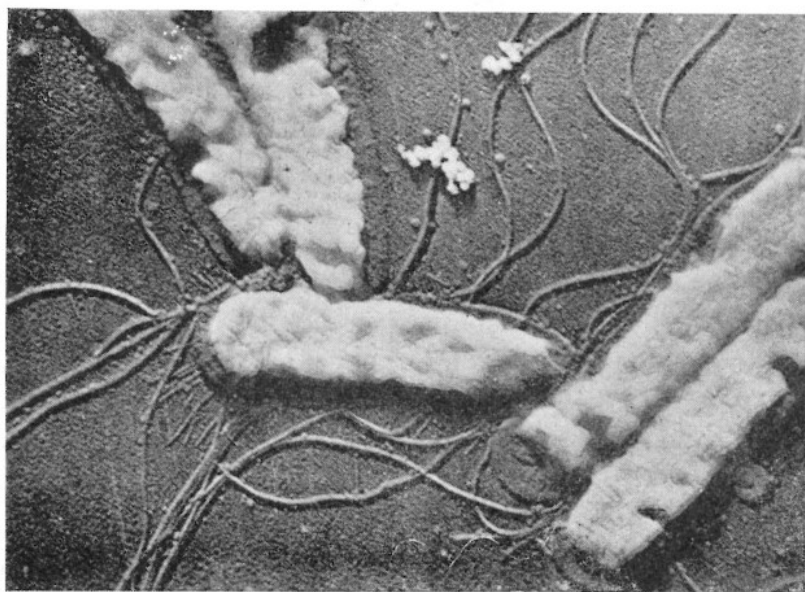


FIG. 3. — *Klebsiella rhinoscleromatis*. Filamenti

Per ovviare a questo inconveniente, sono ricorso ad un accorgimento tecnico che ritengo interessante qui esporre.

Avevo già notato da parecchi anni che distendendo sulla superficie di una piastra, un foglietto di cellophane, e seminando su di esso un germe, questo si sviluppa rigogliosamente,

come se si trovasse sull'agar stesso. Evidentemente attraverso al cellophane dializzano in quantità sufficiente gli elementi necessari al metabolismo del germe.

Di questa osservazione mi son valso anche per eseguire alcune ricerche sulla reciproca azione antibiotica o probiotica di alcuni germi, seminando uno di questi sul cellophane e un altro sull'agar sottostante o incorporandolo ad esso.

La stessa tecnica ho adottato per l'allevamento di colture da osservarsi al supermicroscopio elettronico. A questo scopo distendo sulla superficie dell'agar un foglietto di cellophane e deposito su questo una goccia d'acqua distillata. Su questa depongo una piccola quantità di germi.

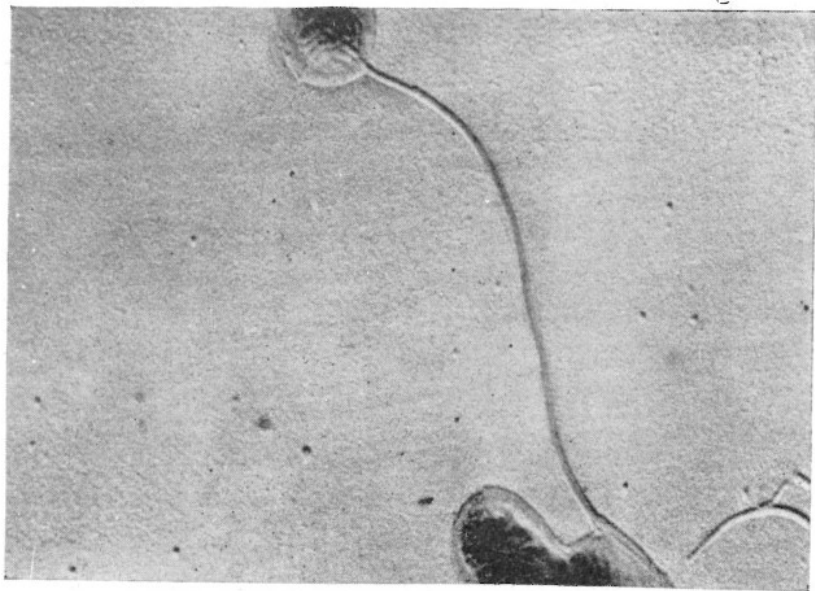


FIG. 4. — *Klebsiella rhinoscleromatis*. Filamenti

La piastra, capovolta, viene poi introdotta in un'altra piastra più grande contenente dell'acqua, e ciò per mantenere l'ambiente umido ed impedire l'essiccamento della goccia insemata. Dopo alcune ore di incubazione eseguisco un passaggio da tale goccia ad una seconda, e ciò per eliminare eventuali impurità portate dalla prima ansata nell'acqua. Qualora lo si desidera, si incorpora a questo punto all'agar sottostante al foglietto di cellophane, un antibiotico o altre sostanze di cui si desidera studiare l'effetto sulla cultura. Dopo un

ulteriore periodo d'incubazione, la cultura è pronta per l'osservazione. Essa viene opportunamente diluita in acqua distillata ed eventualmente fissata. Evidentemente attraverso al cellophane passano sali ed altre sostanze che vengono utilizzate dai germi, però in misura così piccola da non

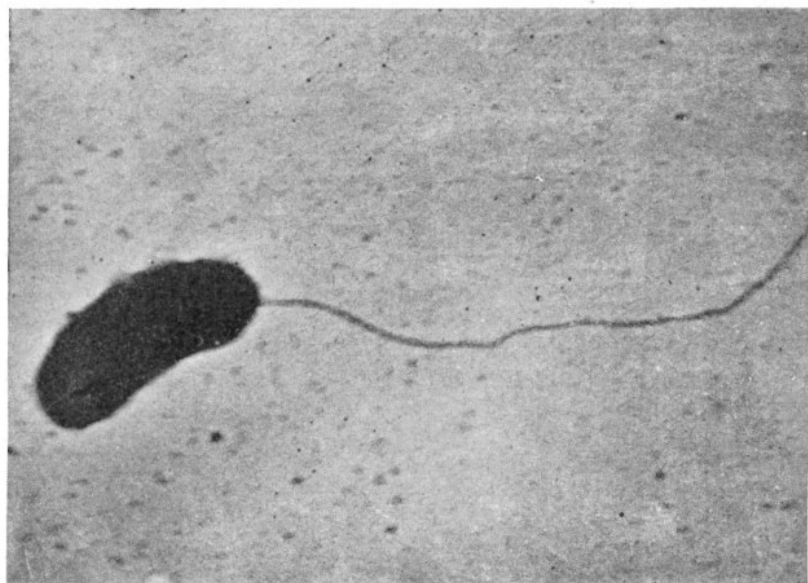


FIG. 5. — *Vibrio cholerae*. Flagello

costituire assolutamente un ostacolo all'osservazione microelettronica.

Adottando questa tecnica sono riuscito a conservare pressochè integro il ricco apparato ciliare di germi che, trattati con la centrifugazione, appaiono quasi nudi di cilia, o a mettere in evidenza la raggera del *Proteus* mai osservata usando la tecnica abituale, o a vedere i sottilissimi e lunghi filamenti che congiungono fra loro i bacilli del rinoscleroma, filamenti che evidentemente si strappano per effetto della centrifugazione e del seguente scuotimento.

Ritengo che molti altri interessanti contributi alla conoscenza della morfologia dei microrganismi possano essere dati da questa tecnica.

Accenno ancora che in una nota pubblicata nel maggio 1947 su *Science*, Harmsen e Kolff ⁽¹⁾ descrivono essi pure una tecnica per la cul-

⁽¹⁾ G. M. HARMSSEN e W. J. KOLFF, Cultivation of Microorganisms with the aid of cellophane membranes, *Science*, 105, 582 (1947).

tura di germi sulle membrane di cellophane ed essi affermano di essere stati i primi a ricorrere a questo procedimento.

I due AA. olandesi si propongono scopi diversi dai miei: devo ad ogni modo rilevare che la loro affermazione non è esatta, perchè io già da anni usavo le culture su cellophane, come risulta anche da un mio lavoro pubblicato nel 1946 ⁽²⁾ e da un altro del 1947 ⁽³⁾.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di batteriologia. 21 genn. 1948.

⁽²⁾ B. BABUDIERI, Azione probiotica e antibiotica di alcuni cocchi sul bacillo di Loeffler, Boll. I.S.M., 25, 215 (1946).

⁽³⁾ B. BABUDIERI, Sull'azione antibiotica di un aspergillo, Rend. Ist. Sup. di Sanità, 10, 253 (1947).
