

62. Franco SCANGA. — L'azione della streptomicina sui germi, osservata al microscopio elettronico con la tecnica delle ombre.

Sommario. — E' stato anzitutto studiato l'andamento della moltiplicazione batterica in una brodo-cultura normale ed in brodo-culture contenenti dosi subinibenti di streptomicina, sia mediante sistematico controllo nefelometrico al Pulfrich, sia mediante conteggio dei germi viventi, con la tecnica delle subculture su piastra. Quindi sono state osservate al microscopio elettronico, utilizzando la tecnica delle ombre, le alterazioni che il *B. coli* subisce, tenuto a contatto, in terreno culturale ed a temperatura di crescita, con dosi subinibenti di streptomicina.

L'azione esplicata dall'antibiotico consisterebbe essenzialmente in un processo di invecchiamento precoce.

Résumé. — L'A. a d'abord étudié la marche de la multiplication bactérienne dans une culture en bouillon normal et dans des cultures en bouillon contenant des doses subinhibantes de streptomycine, soit au moyen d'un contrôle néphélométrique systématique avec le photomètre de Pulfrich, soit en faisant un compte des germes vivants, en utilisant la technique des sous-cultures sur plaque. Il a étudié ensuite sous le microscope électronique, par l'application de la technique des ombres, les altérations que le *B. coli* subit lorsqu'il est tenu en contact, dans un milieu de culture et à la température de développement microbien, avec des doses subinhibantes de streptomycine.

L'action exercée par l'antibiotique consisterait essentiellement dans un procès de *vieillessement précoce*.

Summary. — The A. has first made a study of the bacterial multiplication in a normal broth culture and in broth cultures containing subinhibiting doses of streptomycin, both by a systematic nephelometric control with Pulfrich photometer and by a count of the living germs, using the technique of sub-cultures on a plate. Afterwards, he has observed with the electron microscope, using the shadow technique, the changes undergone by *B. coli* when it is kept in contact, in a culture medium at growth temperature, with subinhibiting doses of streptomycin.

The action exerted by the antibiotic appears to consist substantially in a process whereby the germ *grows old precociously*.

Zusammenfassung. — Der Verfasser hat zuerst den Gang des Bakterienwachstums in einer normalen Bouillonkultur und in subinhibierende Dosen von Streptomycin enthaltenden Bouillonkulturen studiert, und dies zwar durch eine systematische nephelometrische Kontrolle mit Pulfrich's Photometer, sowie auch durch Zählung der lebenden Bakterien unter Anwendung der Technik der Subkulturen auf Platte. Er hat dann auch mit dem Elektronenmikroskop, die Schattentechnik benutzend, die Veränderungen studiert, denen der *B. coli* unterliegt, wenn er im Kulturmedium bei Wachstumstemperatur in Kontakt mit subinhibierenden Dosen von Streptomycin gehalten wird.

Die vom Antibiotikum ausgeübte Wirkung sollte hauptsächlich in einem Prozess bestehen, welcher *ein frühzeitiges Altwerden* der Bakterien bewirkt.

Scopo di questa pubblicazione (*) è di mostrare alcune modificazioni strutturali e morfologiche che i germi subiscono per azione della streptomina, come appaiono con l'osservazione al microscopio elettronico, servendosi della così detta « tecnica delle ombre ».

Gli studi che, per mezzo del microscopio elettronico, si compiono all'Istituto Superiore di Sanità, risalgono ormai a diversi anni e ad essi si dedicano non solo batteriologi dell'Istituto stesso, ma anche ricercatori e medici di altri Istituti e Cliniche.

Il perfezionamento tecnico a cui tali ricerche sono arrivate, rende possibili osservazioni complete e precise in ogni dettaglio; è precipuo merito del prof. Trabacchi e della prof. Bocciarelli, del Laboratorio di fisica, che sono riusciti, con i mezzi tecnici a disposizione dell'Istituto, a costruire ex novo, uno strumento complesso quale il microscopio elettronico.

Ad essi rivolgo il mio ringraziamento, che desidero anche estendere al dott. M. Castagnoli, il quale mi ha seguito nella osservazione tecnica dei numerosi preparati.

(*) Comunicazione fatta all'Accademia Medica di Roma, nella seduta del 29 maggio 1948.

In una precedente nota comunicata, in collaborazione con Penso, al Congresso Internazionale di Microbiologia di Copenaghen del 1947 ⁽¹⁻²⁾, è stato già riferito sull'azione esplicata dalla streptomycina, in *dosi subinibenti*, sui germi in fase biotica, vale a dire sui germi in via di sviluppo, mantenuti in terreno culturale ed a temperatura di crescita.

Con queste nuove ricerche mi propongo di studiare più particolarmente l'azione esplicata dalla streptomycina, non solo valendomi di una particolare tecnica di osservazione al microscopio elettronico, ma anche seguendo le curve di crescita dei germi trattati e non trattati, mediante controllo opacimetrico e conteggio sistematico degli organismi viventi.

Il germe impiegato per tutte le prove è un ceppo di *B. coli*, proveniente dalla collezione dell'Istituto. La quantità di streptomycina che inibisce parzialmente la crescita del germe, varia da 1 a 6 U.W/cm³.

1) *Studio nefelometrico*. — Ho voluto anzitutto osservare l'andamento della moltiplicazione batterica, sia in una brodo-cultura normale che in brodo-cultura contenenti dosi subinibenti di streptomycina, mediante sistematico controllo nefelometrico al Pulfrich.

L'osservazione è stata compiuta, per ciascuna brodo-cultura, ad intervalli vari ed i risultati sono riportati nel seguente grafico (grafico 1).

Nella brodo-cultura normale il grado opacimetrico, dopo essere rimasto immutato per circa due ore, mostra un rapido aumento, raggiungendo, in 36-48 ore, un livello massimo, che si mantiene poi immutato.

Si avrebbe cioè una fase di latenza di circa 2 ore, seguita da una successiva fase di moltiplicazione logaritmica fino alla 48^a ora, a cui seguirebbe la fase « stazionaria » (resting).

Nelle brodo-culture con dosi subinibenti di streptomycina si osserva un prolungamento del periodo di latenza, che è tanto maggiore quanto più alta è la concentrazione dell'antibiotico; in seguito il grado opacimetrico aumenta, ma in maniera sempre inferiore al controllo; un tale aumento però persiste, sia pure in misura molto ridotta, fino a 96 ore mancando un vero e proprio periodo stazionario.

La linea 4 mostra solo un piccolo aumento del grado opacimetrico: vedremo dopo l'importanza di tale fatto.

(1) G. PENSO e F. SCANGA, Rend. Ist. Sup. San., 10, 633 (1947).

(2) G. PENSO e F. SCANGA, Rend. Ist. Sup. San., 10, 639 (1947).

Qui si potrebbe formulare l'obiezione che lo sviluppo batterico dopo 6 e 24 ore nelle brodo-culture contenenti dosi subinibenti di streptomicina, sia dovuto all'inattivazione dell'antibiotico per la sua permanenza a 37° C. Controlli del titolo, eseguiti però, prima e durante le prove, hanno dimostrato che la streptomicina non subisce alcuna apprezzabile inattivazione.

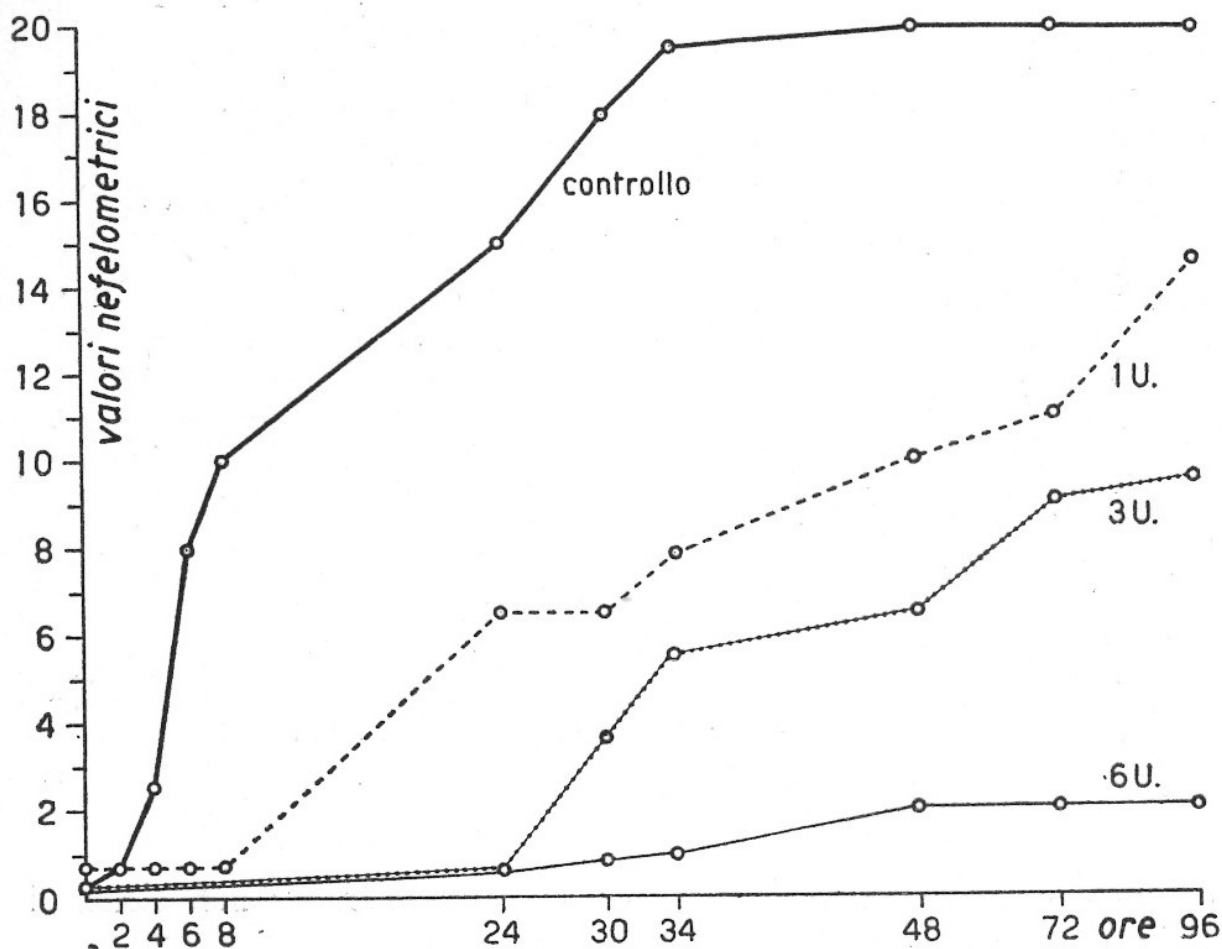


GRAFICO 1.

2) *Studio dei germi viventi.* — La precedente ricerca è però da sola insufficiente: è risaputo infatti che in una brodo-cultura contenente streptomicina, si possono avere modificazioni strutturali nel corpo batterico, con ingrossamenti e rigonfiamenti tali da rilevare un aumento del grado opacimetrico, senza che si abbia un corrispondente effettivo aumento del numero dei germi.

Onde stabilire con una certa precisione fino a qual punto l'aumento del grado opacimetrico fosse dovuto alla moltiplicazione dei germi e all'azione diretta dell'antibiotico sul corpo batterico, ho ricercato ad intervalli regolari di tempo quale fosse il numero effettivo dei germi viventi,

con la tecnica delle subculture in piastra. I risultati, riportati nel graf. 2, mostrano che sia nella brodo-cultura controllo, che in quelle contenenti streptomicina, le curve opacimetriche e quelle dei germi vitali procedono quasi parallelamente.

Fa eccezione l'andamento della curva 4: mentre nello specchio opacimetrico essa è leggermente in aumento fino alla 48^a ora, per poi rima-

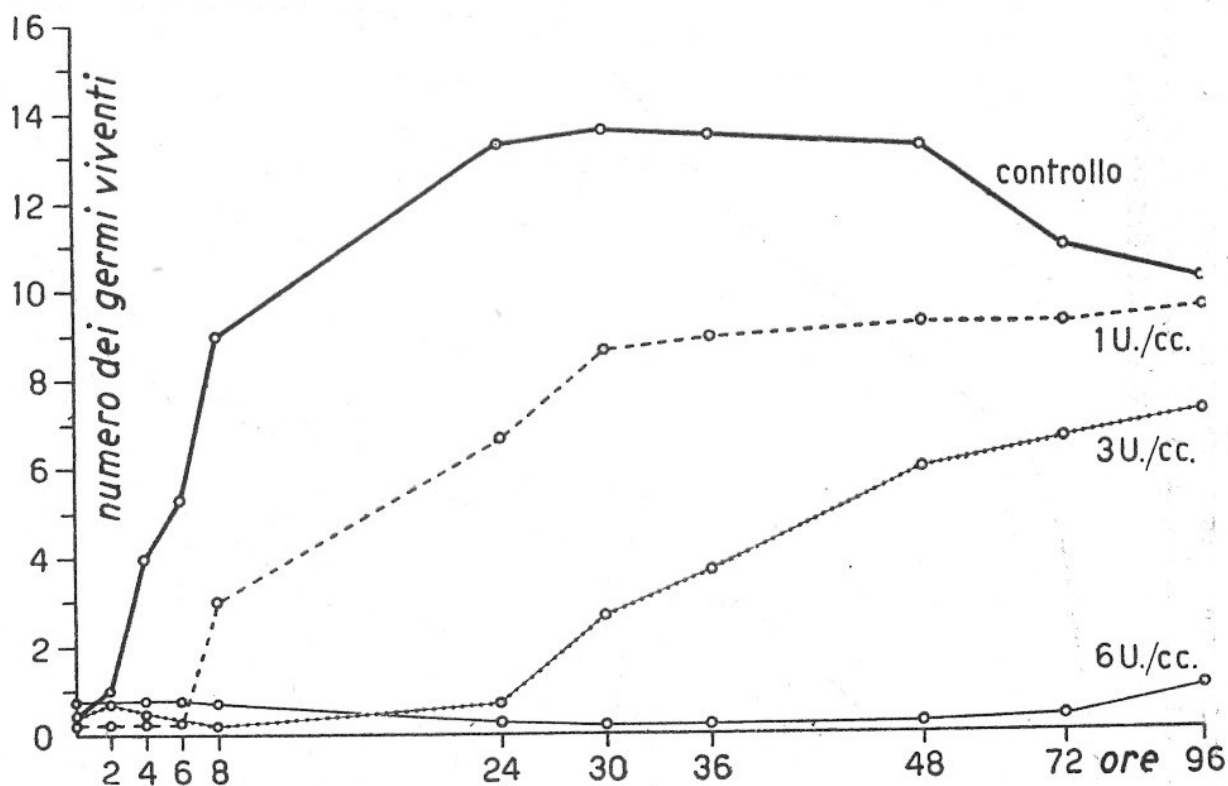


GRAFICO 2.

nere costante, nello specchio vitale è invece in continua diminuzione. Si verifica cioè che pur bloccando la streptomicina la moltiplicazione batterica, si ha nelle prime 48 ore un leggero aumento dell'opacimetria, imputabile, verosimilmente, alle alterazioni morfologiche determinate dall'antibiotico sui germi: ingrossamento del corpo batterico.

3) *Osservazione al microscopio elettronico.* — Come è noto, per l'osservazione di un preparato al microscopio elettronico, bisogna attenersi alle seguenti norme generali:

1) si fissa e si lava il materiale da esaminare, onde allontanare le impurità presenti;

2) si sospende il materiale in acqua distillata;

3) una goccia di tale sospensione viene posta sulla pellicola di collodio e si lascia seccare;



Fig. 1. - B. coli da brodocoltura normale di 24 ore: elemento a protoplasma compatto, omogeneo: membrana pericellulare invisibile (X 40.000).



Fig. 2. - B. coli da brodocoltura normale di 24 ore: il protoplasma batterico per quanto ancora compatto e omogeneo, incomincia a distaccarsi dalla membrana cellulare (X 40.000).

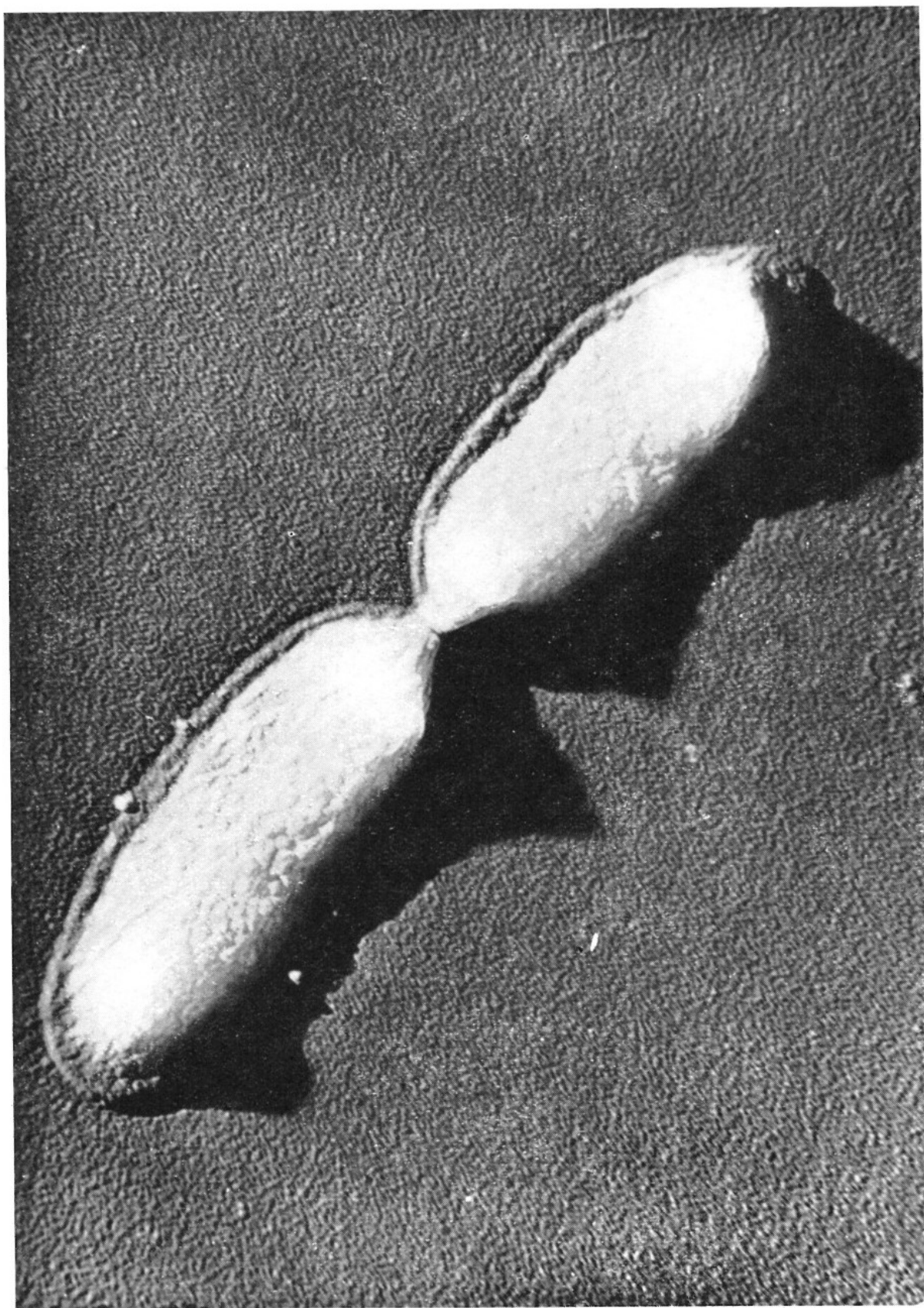


Fig. 3. - *B. coli* da brodocoltura normale di 24 ore: elemento in divisione avanzata (X 40.000).

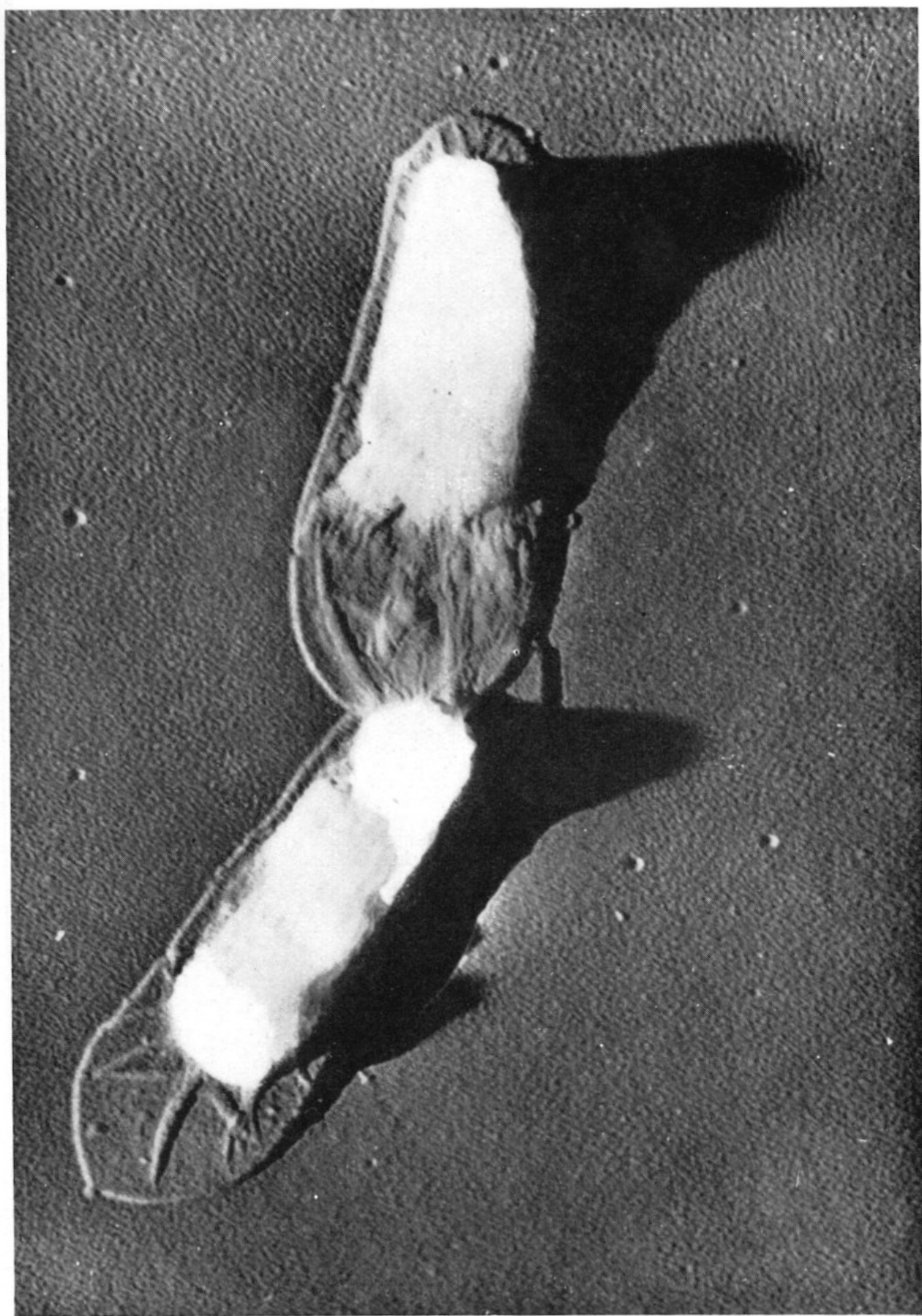


Fig. 4. - *B. coli* da brodocoltura di 24 ore con streptomicina: membrana cellulare distaccata nettamente dal protoplasma (X 40.000).

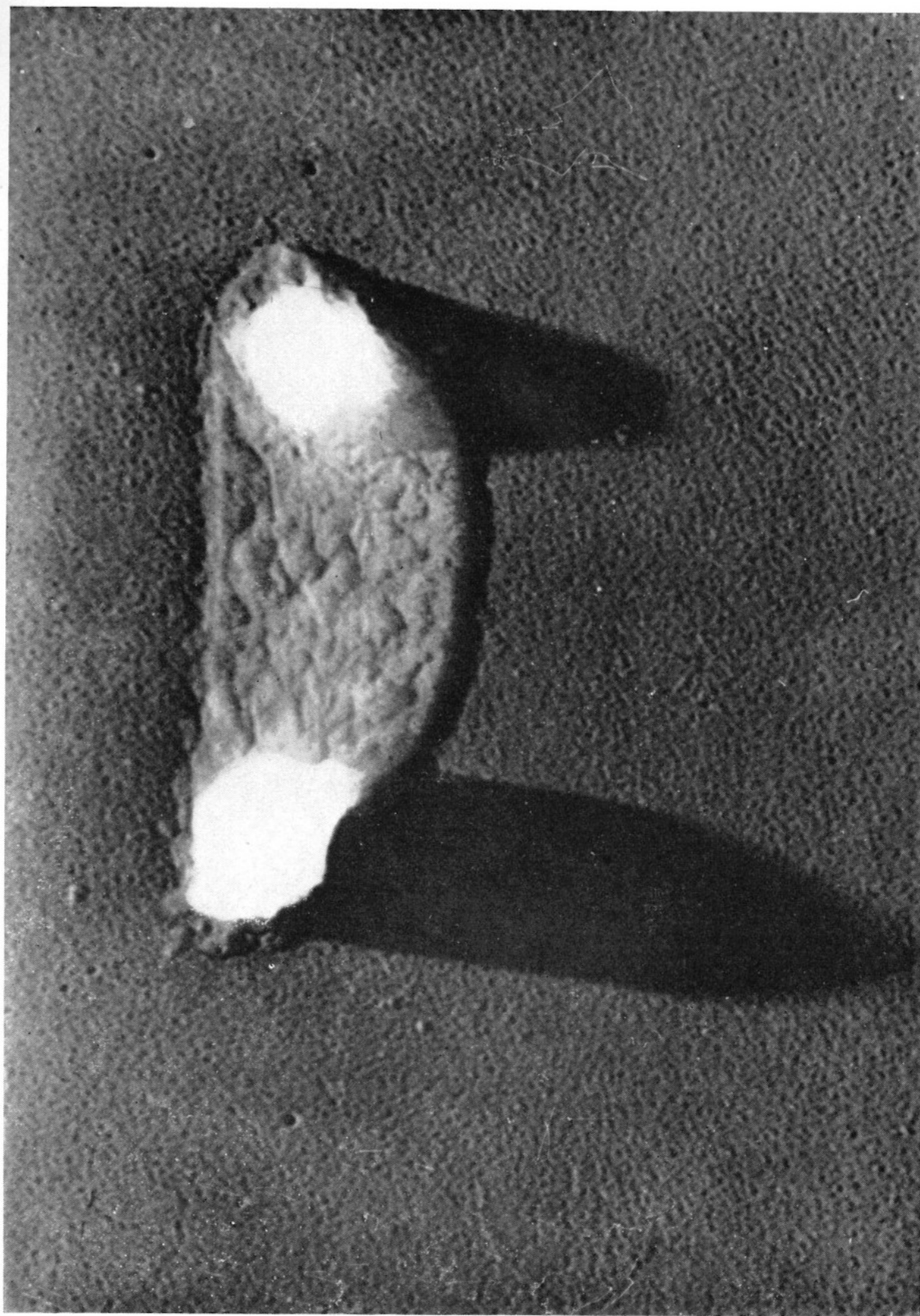


Fig. 5. - B. coli da brodocoltura di 24 ore con streptomicina: schiarimento centrale dello stroma protoplasmatico con appiattimento del corpo batterico (X 40.000).

F. SCANGA. - *L'azione della streptomicina sui germi, studiata al microscopio elettronico con la tecnica delle ombre.*

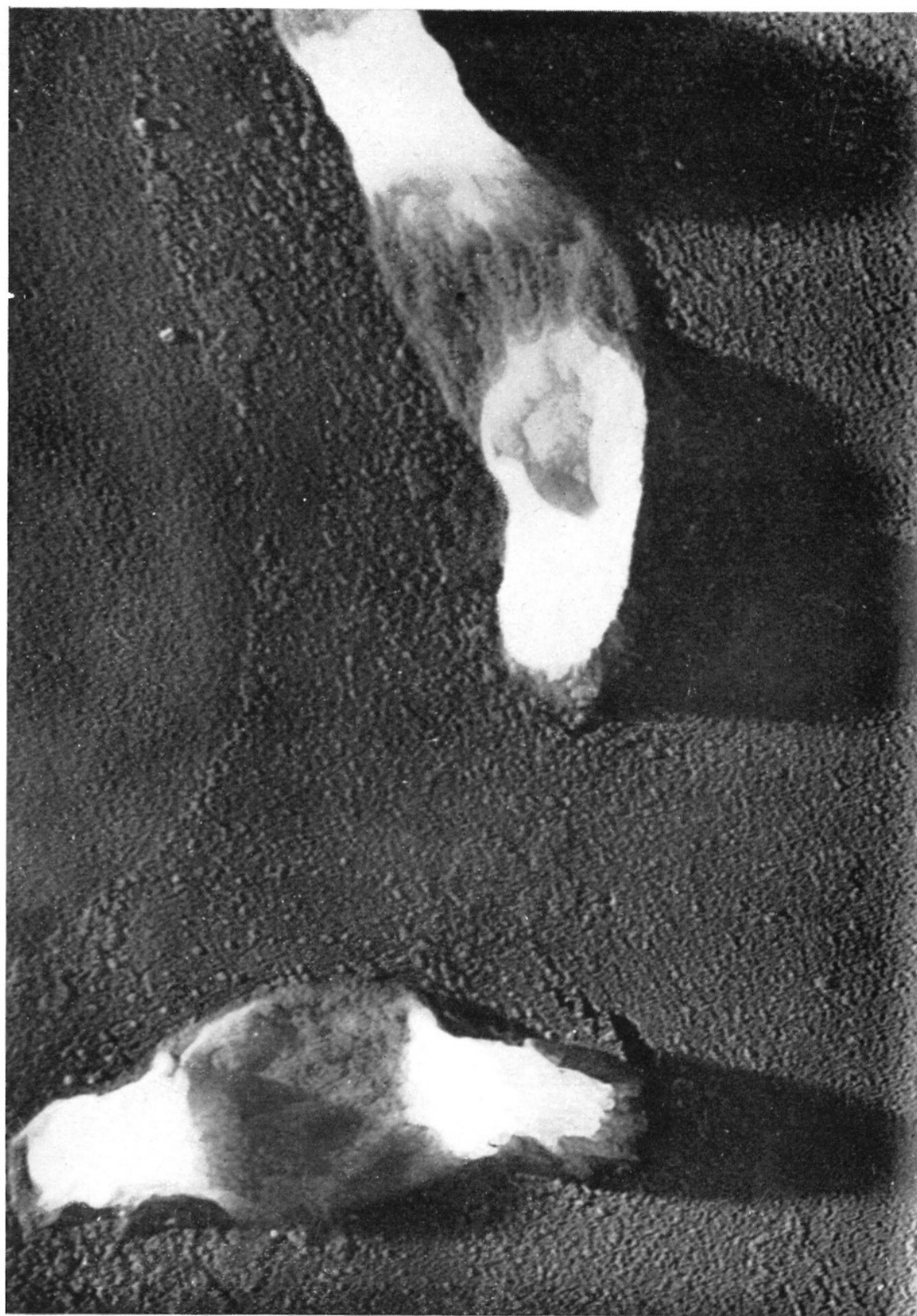


Fig. 6. - B. coli da brodocoltura di 24 ore con streptomicina: elementi allungati e ingrossati, con il caratteristico schiarimento del protoplasma nella parte centrale (X 40.000).

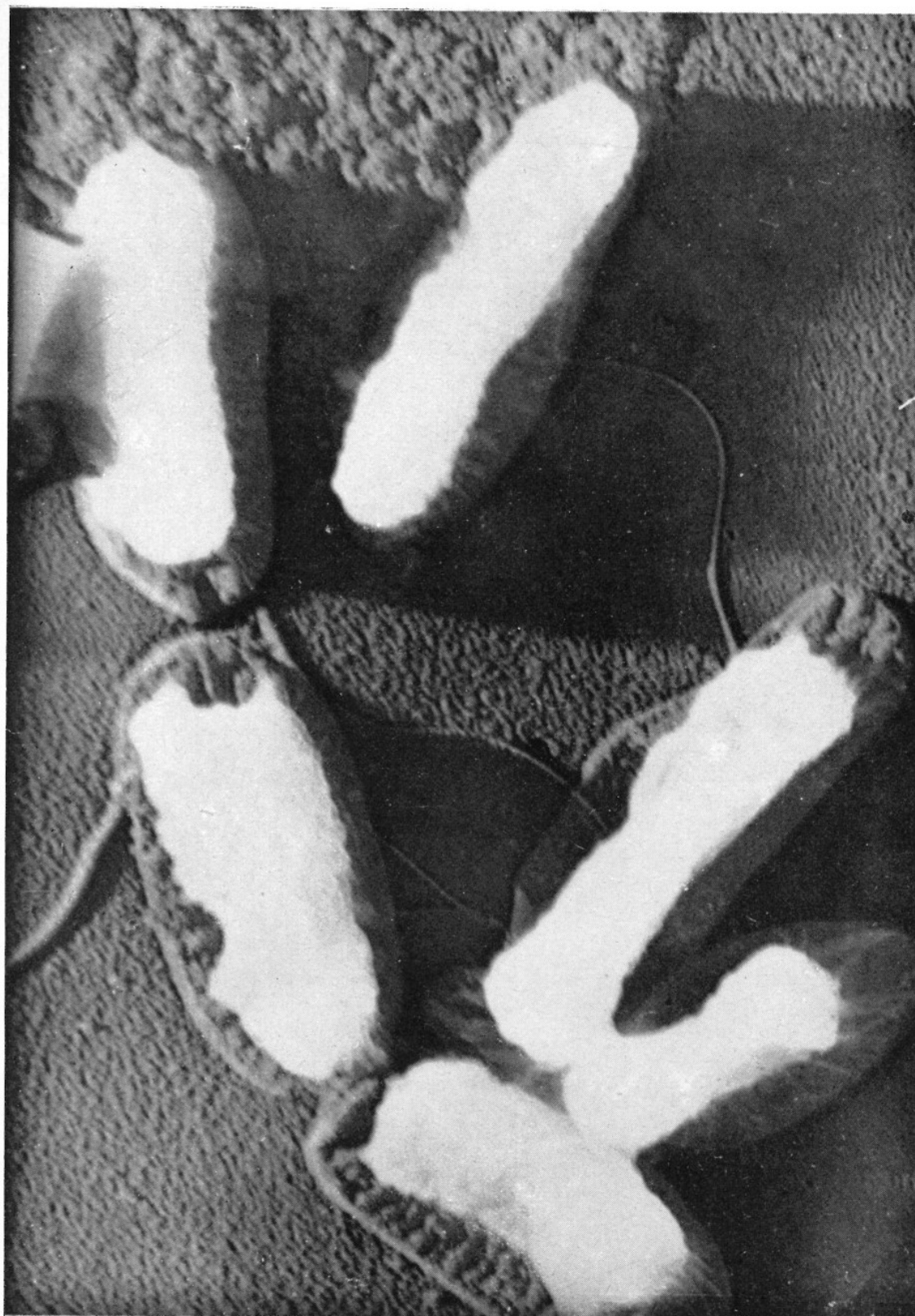


Fig. 7. - *B. coli* da brodocoltura normale di 48 ore: protoplasma ancora compatto, ma nettamente distaccato dalla membrana cellulare; è visibile qualche ciglia batterica (X 40.000).



Fig. 8. - B. coli da brodocoltura normale di 48 ore: l'ombra rivela ancora una discreta pienezza del corpo batterico (X 40.000).



Fig. 9. - B. coli da brodocoltura di 48 ore con streptomicina: corpo batterico allungato, ingrossato, di forma irregolare e con protoplasma parzialmente chiarificato (X 40.000).

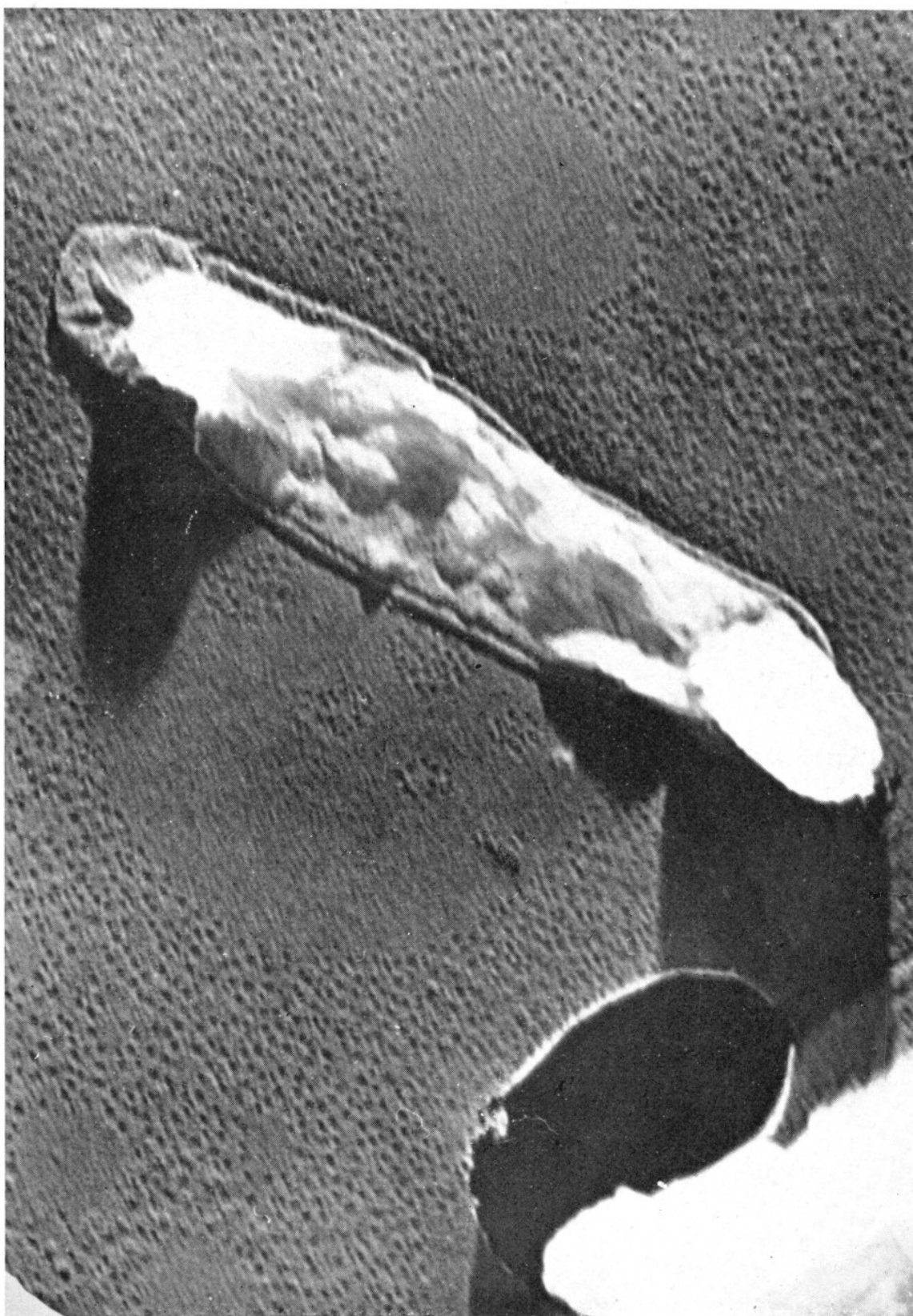


Fig. 10. - B. coli da brodocoltura di 48 ore con streptomicina: con la metallizzazione si riesce ad evidenziare bene la struttura del protoplasma (X 40.000).

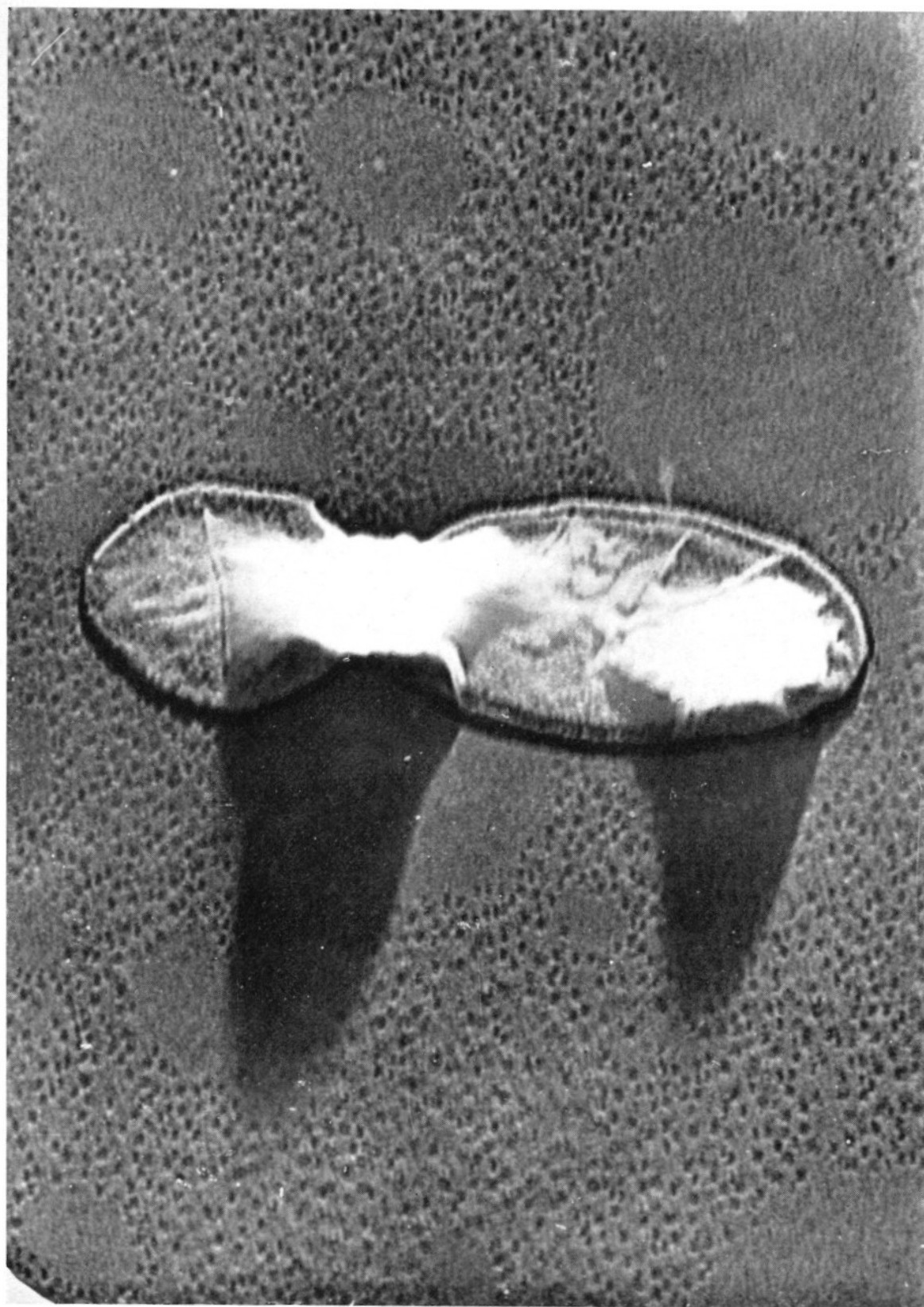


Fig. II. - B. coli da brodocoltura di 48 ore con streptomicina: l'appiattimento del corpo batterico risalta con evidenza (40.000).



Fig. 12. - B. coli da brodocoltura normale di 72 ore: il corpo bacillare, pur presentando uno schiarimento del protoplasma, conserva la sua forma regolare (X 40.000).



Fig. 13. - B. coli da brodocoltura normale di 72 ore: la metallizzazione riesce a mettere in evidenza la chiarificazione e la coartazione non uniforme dello stroma protoplasmatico (X 40.000).

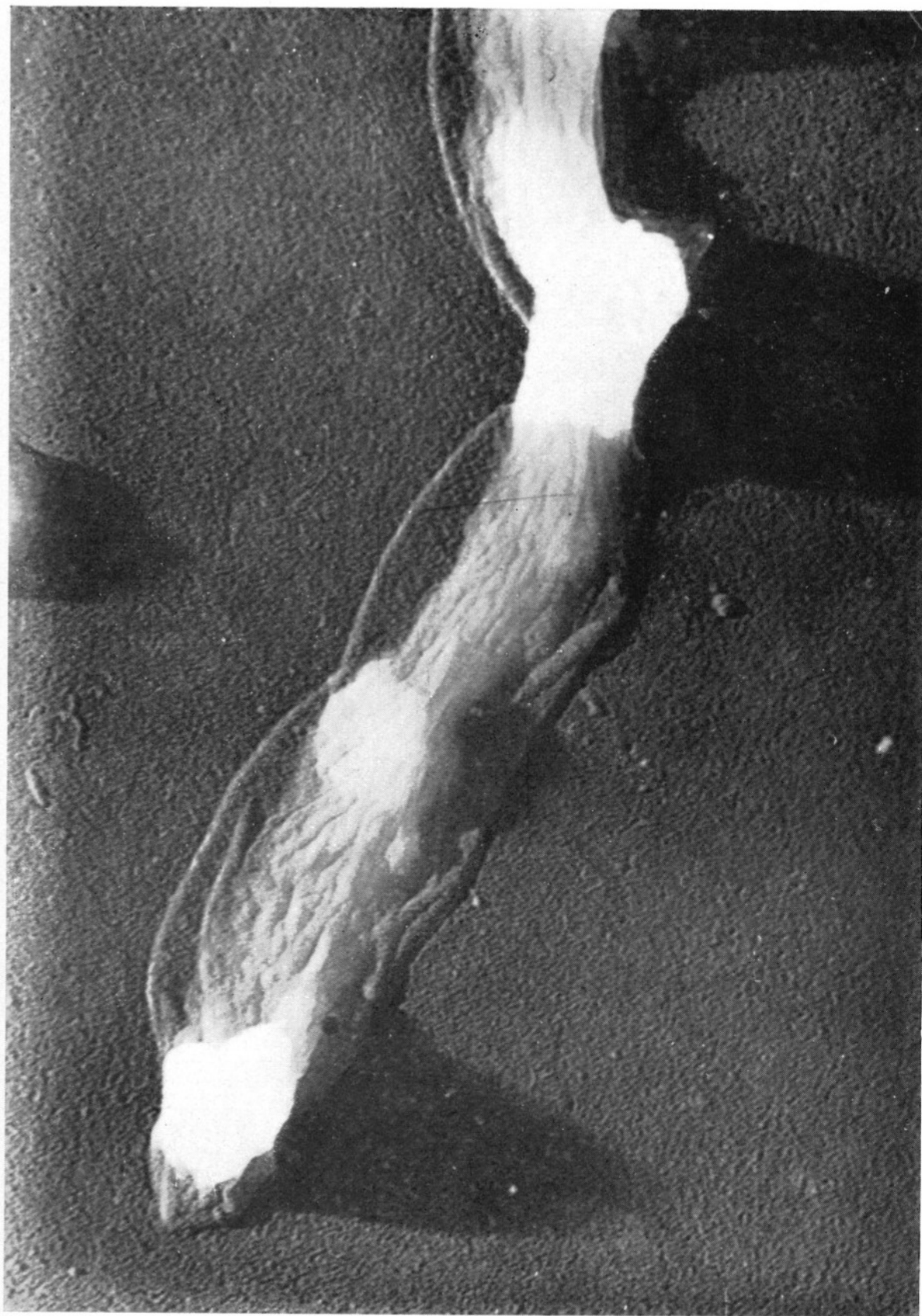


Fig. 14. - *B. coli* da brodocoltura di 72 ore con streptomicina: forme batteriche allungate, enormi, irregolari, con ampie zone di chiarificazione del protoplasma (X 40.000).

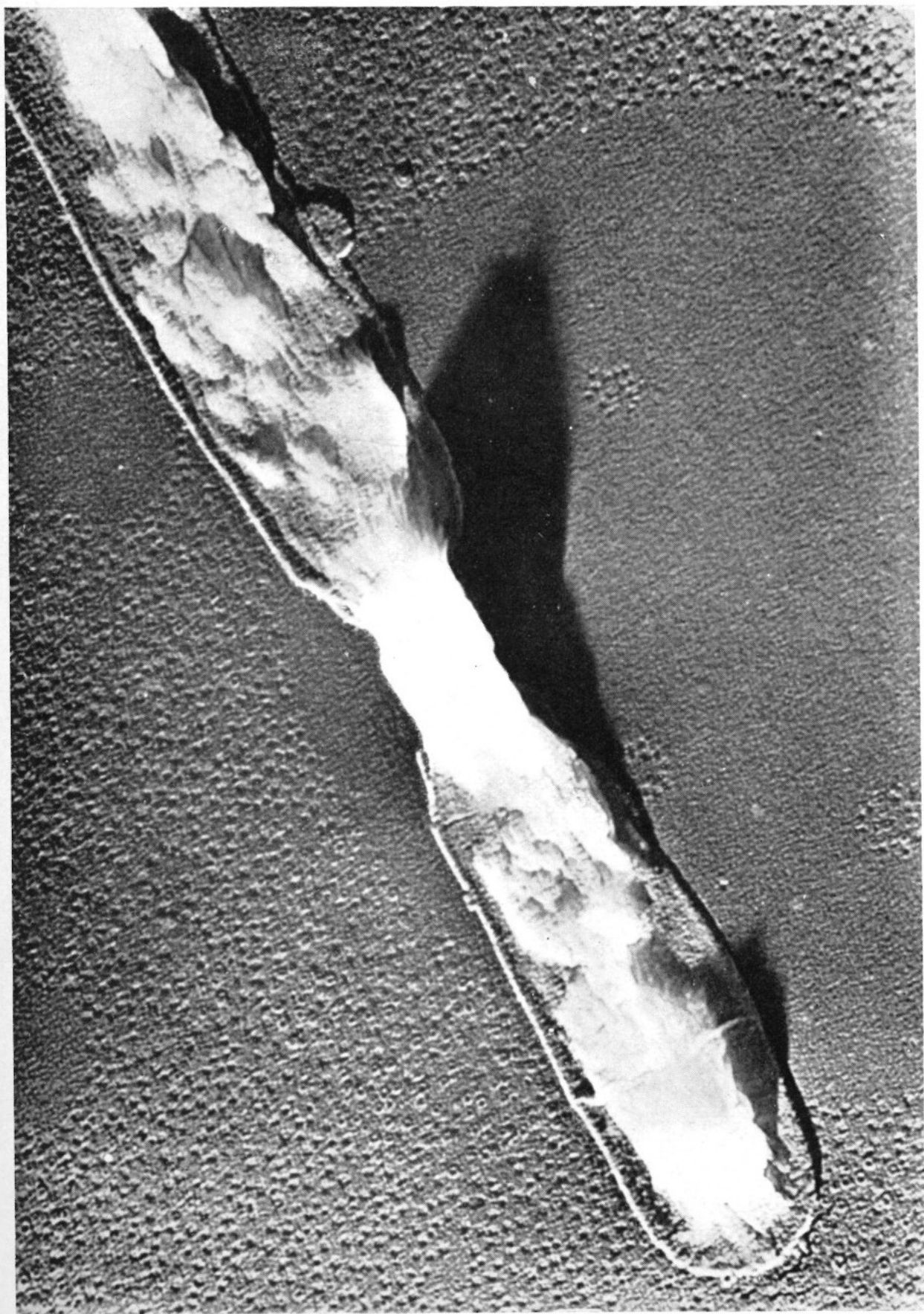


Fig. 15. - *B. coli* da brodocoltura di 72 ore con streptomicina: forma batterica bloccata nella sua fase di divisione (?), (X 40.000).

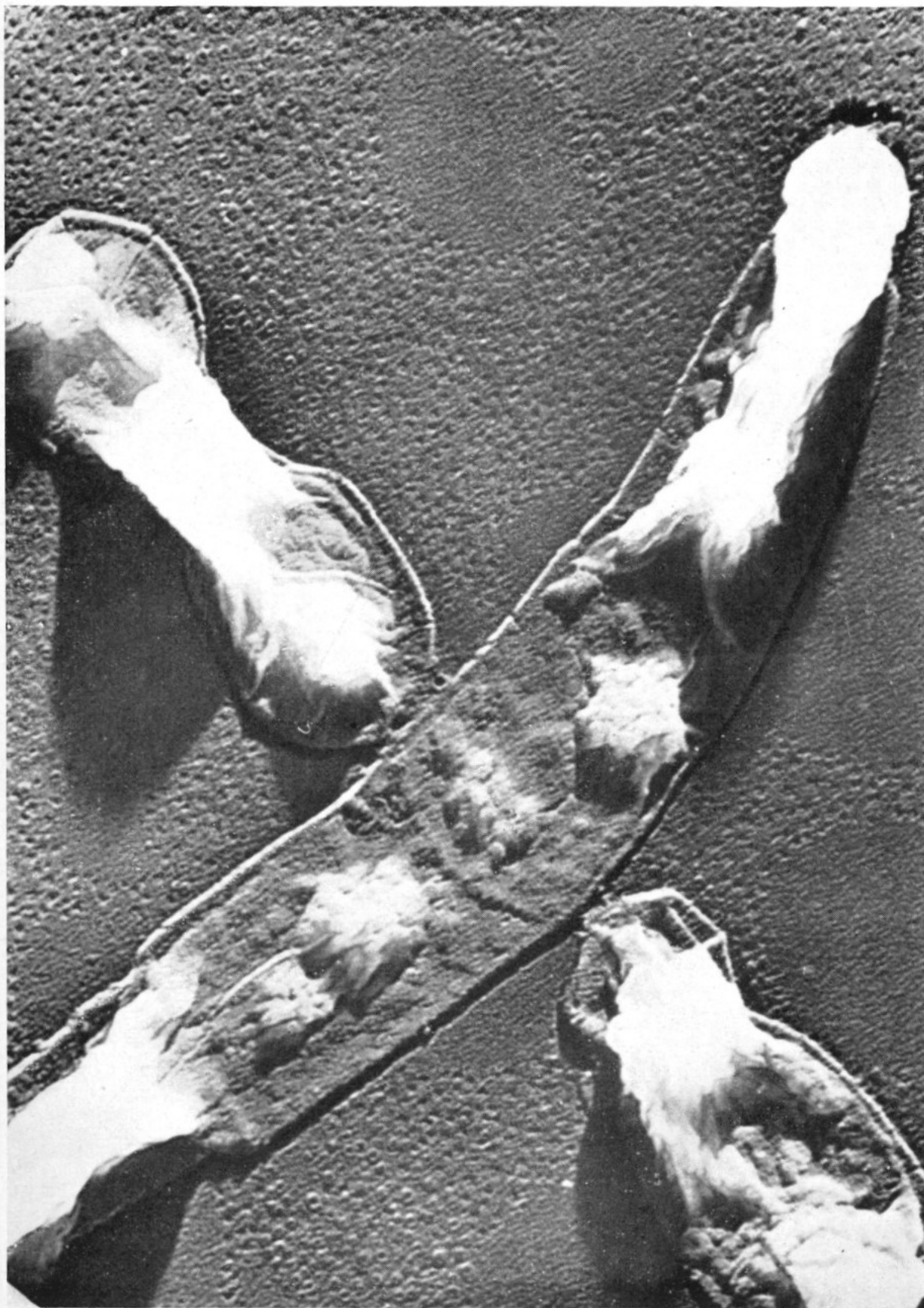


Fig. 16. - B. coli da brodocoltura di 72 ore con streptomicina: in alcune parti la membrana appare schiacciata, come un sacco vuotato del suo contenuto (X 40.000).

4) si procede quindi all'osservazione microscopica, tenendo presente che, mentre il microscopio ottico mostra la distribuzione del colore nell'oggetto, il microscopio elettronico rivela solo la distribuzione della massa nell'oggetto, per cui l'impiego dei comuni coloranti non può trovare alcuna utile applicazione.

Ove si voglia evidenziare meglio la distribuzione della massa nell'oggetto, bisognerà ricorrere all'uso di sostanze che, al contrario dei comuni coloranti, risultino opache ai raggi elettronici.

Secondo una particolare tecnica descritta per la prima volta da Williams e Wickoff⁽³⁻⁴⁻⁵⁾, vengono appunto impiegate particelle di metallo come l'oro, l'argento, il cromo, con le quali si determina la cosiddetta « metallizzazione » del preparato, rendendosi così possibile l'osservazione di particolari strutturali che non sarebbero rilevabili con la semplice osservazione diretta, senza metallizzazione.

Bocciarelli e Trabacchi hanno messo a punto un procedimento molto pratico per ottenere la metallizzazione dei preparati da osservare al microscopio elettronico⁽⁶⁾. Tale tecnica, consiste essenzialmente nel portare il materiale montato sulla membrana di collodio all'interno di un cilindro (graf. 3) dove viene praticato un vuoto molto spinto, e nel proiettare quindi sul preparato, sotto un determinato angolo di incidenza, delle particelle metalliche di dimensioni molecolari originate da un metallo che, portato all'incandescenza, evapora nel vuoto.

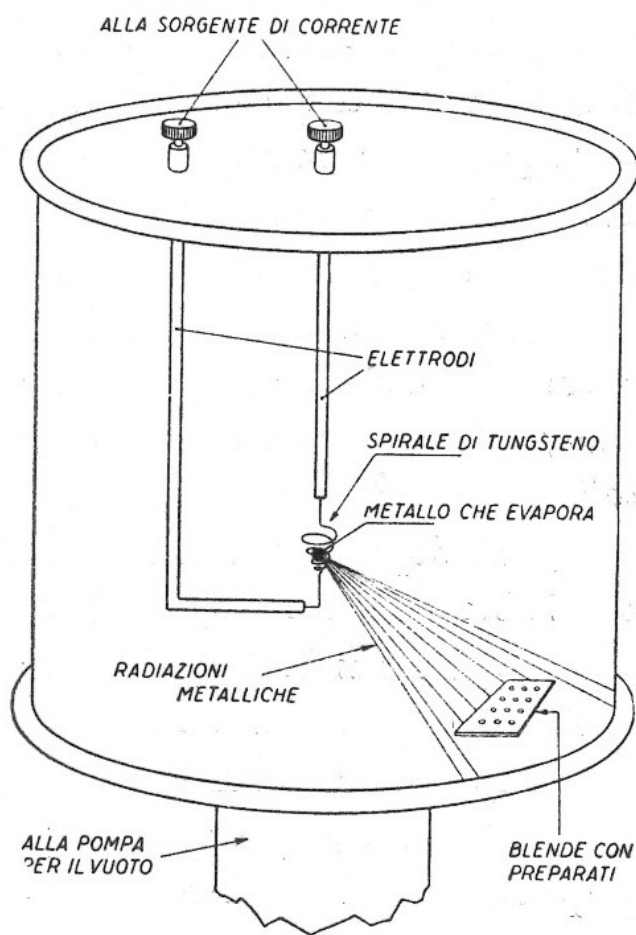


GRAFICO 3.

(3) WILLIAMS e WYCKOFF, J. Appl. Phys., 15, 712 (1944).

(4) WILLIAMS e WYCKOFF, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 58, 265 (1945).

(5) WILLIAMS e WYCKOFF, J. Appl. Phys., 17, 23 (1946).

(6) D. BOCCIARELLI e G. C. TRABACCHI, Rend. Ist. Sup. San. (in corso di stampa).

La proiezione delle molecole metalliche che, con un vuoto molto alto, ha un decorso rettilineo, investe, secondo un determinato angolo di inclinazione l'oggetto e determina un deposito di metallo sulle parti del preparato e della membrana supporto esposte all'irraggiamento, mentre quelle parti del preparato e della membrana che sono al riparo della traiettoria delle molecole, non vengono ricoperte dal tappeto metallico. Perciò, all'osservazione microscopica, si avrà che le parti ricoperte dalle molecole metalliche intercetteranno più o meno i raggi elettronici, risultando più spesse, mentre le parti poste al riparo dall'irraggiamento non solo risulteranno meno spesse, quanto anche appariranno in ombra, venendo così a realizzare come un'immagine a rilievo.

La tecnica da me impiegata è la seguente: 1) in provette contenenti 5 cm³ di brodo carne a pH 7,2, si aggiunge la streptomycina (1-2 U.W./cm³) e quindi un'ansata di brodo-cultura di 18 ore di *Escherichia coli*.

2) dopo permanenza in termostato rispettivamente per 24-48-72 ore, le brodo-culture vengono centrifugate a 1500 giri al minuto per 20'.

3) i sedimenti vengono trattati con 5 cm³ di una soluzione di formalina al 10%, agitati e centrifugati a 1500 giri per 20'.

4) ciascun sedimento viene nuovamente raccolto con 5 cm³ di acqua bidistillata, agitato e centrifugato per 20' a 1500 giri. Per avere preparati ben puliti, è bene che questa operazione sia ripetuta due volte.

5) ogni sedimento viene raccolto con 1-2 cm³ di acqua bidistillata e agitato; quindi si pone una goccia di ciascuna sospensione sopra le blende e, attesone l'essiccamento, si procede alla metallizzazione del preparato secondo la tecnica descritta da Bocciarelli e Trabacchi. Dopo di che i preparati sono pronti per l'osservazione al microscopio elettronico.

I risultati che si ottengono con tale procedimento, se pure essenzialmente confermano quelli già rilevati con la tecnica di osservazione diretta, senza alcun trattamento (¹), mostrano tuttavia dettagli di struttura e di morfologia, che precedentemente non si erano potuti evidenziare.

Prima di procedere alla descrizione dei preparati studiati, è bene fare questa premessa: l'osservazione al microscopio elettronico di un organismo coltivato a 37° C in un *terreno liquido* mostra la presenza di elementi, per i quali si potrà stabilire ovviamente solo l'età massima di svi-

luppo, nel senso che se si osserverà una brodo-cultura di 24 ore, nessuno degli elementi osservati potrà avere un'età superiore a tale tempo, ma è evidente che accanto a queste forme vi saranno ugualmente organismi giovani che avranno soltanto qualche ora di vita.

Pertanto, quando io parlerò di coli di 24-48-72 ore, intenderò riferirmi a quegli elementi che, dopo numerose osservazioni fatte, risulteranno presenti in prevalenza nella cultura di quella determinata età.

E' ovvio infatti che in una cultura di 96 ore potranno capitare all'osservazione anche elementi giovani, ma sarà il prevalere di forme adulte e vecchie che io prenderò in considerazione e che porterò come esponenti di una cultura di tale età.

Questa premessa mi è sembrata necessaria per evitare possibili equivoci nell'interpretazione dei risultati.

1) *Escherichia coli*, da brodo-cultura normale di 24 ore (fig. 2-3-4). — Prevalgono forme piuttosto allungate, ma ancora regolari, con protoplasma che, se anche non è del tutto omogeneo, si mantiene ancora più o meno compatto, con tendenza a mostrare degli addensamenti alle estremità e qualche volta anche al centro del corpo batterico.

La membrana pericellulare è ben visibile, ma ancora appare poco distaccata dallo stroma protoplasmatico, al quale, in qualche punto è congiunto da sottili filamenti. La figura 3 mostra un elemento in avanzata divisione. La metallizzazione del preparato, oltre a rivelare particolari di struttura del protoplasma, ne mette in evidenza il maggiore o minore spessore per mezzo delle ombre, che appaiono proiettate sulla pellicola di collodio.

2) *Escherichia coli*, da brodo-cultura di 24 ore con dosi subinibenti di streptomicina (fig. 5-6). — I microrganismi appaiono generalmente più allungati, ingrossati ed hanno perduto la forma regolare. Il protoplasma è diminuito di compattezza, soprattutto al centro del corpo batterico, mentre si ha, agli estremi, un addensamento piuttosto accentuato. In corrispondenza delle parti in cui si nota uno schiarimento dello stroma protoplastico, il microrganismo appare come ingrossato, così che, in tali punti, i limiti del corpo batterico debordano in confronto a quelli delle zone in cui ancora il protoplasma è addensato e compatto.

Le ombre mostrano anche che nelle parti schiarite il corpo batterico è come schiacciato, mentre nelle parti compatte esso conserva una certa pienezza.

3) *Escherichia coli*, da brodo-cultura normale di 48 ore (fig. 7-8). — Il distacco tra il protoplasma e la membrana pericellulare si fa ancora più evidente e marcato. In qualche caso il protoplasma sembra come coartato, restando in collegamento con la membrana mediante sottilissime lacinie di raccordo. I margini protoplasmatici sono talvolta irregolari. L'ombra rivela una discreta pienezza delle parti compatte.

4) *Escherichia coli*, da brodo-cultura di 48 ore con dosi subinibenti di streptomicina (fig. 9-10-11). — Elementi allungati, di forma molto irregolare. Sono visibili ampie zone di protoplasma chiarificato, mentre al centro od alle estremità persistono zone di protoplasma compatto, i cui margini sono variamente ripiegati. Nelle parti chiarificate il corpo batterico appare, come al solito, schiacciato, come il fondo di un sacco svuotato del suo contenuto: manca infatti ogni accenno di ombra. La metallizzazione del preparato viene anche a mettere in evidenza la struttura non uniforme del protoplasma.

5) *Escherichia coli*, da brodo-cultura normale di 72 ore (fig. 12-13). — Lo schiarimento protoplasmatico si fa più marcato, residuandone degli addensamenti di forma circolare, di compattezza minore a quella delle culture di 48 ore, e che rivelano una leggera formazione di ombra (fig. 12). Talvolta il protoplasma appare coartato verso la parte centrale del corpo batterico e mostra uno spessore disuguale, che il procedimento di metallizzazione riesce bene a mettere in evidenza (fig. 13).

6) *Escherichia coli*, da brodo-cultura di 72 ore con dosi subinibenti di streptomicina (fig. 14-15-16). — L'allungamento del corpo batterico è più accentuato: alcuni elementi, pur restando invariato l'ingrandimento microscopico, non si riesce a farli entrare completamente nel campo di osservazione. Il protoplasma, se si esclude l'addensamento generalmente limitato alle due estremità del corpo batterico, appare ridotto a qualche piccola isola; in alcune parti il corpo batterico sembra svuotato di ogni suo contenuto: la tecnica delle ombre riesce a mostrare fini particolari di struttura. La figura 16 mostra un elemento rimasto forse bloccato nel processo di divisione.

Queste osservazioni, che la tecnica di metallizzazione dei preparati ha reso più complete e più particolareggiate, mostrano che il *B. coli*, in brodo-cultura senza antibiotico, evolve la sua *facies* strutturale nel senso che le forme giovani si presentano più o meno allungate, a protoplasma omogeneo, compatto, non trasparente, a membrana pericellulare invisibile: man mano che le culture invecchiano si nota la prevalenza di forme allungate, con coartazione e chiarificazione del protoplasma, mentre la membrana pericellulare diviene completamente distaccata dal corpo batterico.

Il *B. coli*, coltivato in presenza di dosi subinibenti di streptomicina, evolve nel senso che sin dalle culture di 24 ore i germi presentano rigonfiamento, distacco della membrana pericellulare, schiarimento protoplasmatico prevalentemente centrale all'inizio, 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 piccoli addensamenti a limiti sfumati, mentre la membrana pericellulare sembra non contenere più nulla. Tali trasformazioni avvengono con rapidità molto maggiore ed in maniera più intensa che non nelle culture normali di *B. coli*.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di batteriologia. 3 giugno 1948.
