

13

2. Giuseppe PENSO. — Studi e ricerche sui micobatteri. - XIII. Sull'esistenza di un micelio vero e ramificato in tutte le specie del genere *Mycobacterium*. (*)

Riassunto. — L'A. descrive il micelio iniziale dei micobatteri; tale micelio è formato da lunghe ife ramificantesi più volte. Tali ife nascono per gemmazione dai singoli batteri e sono fragilissime; per ottenerle e vederle chiaramente occorre far crescere i micobatteri sullo stesso vetrino o sulla stessa membrana di collodio che servirà alla osservazione ottica o elettronica.

Résumé. — L'auteur décrit le mycélium initial des mycobactéries; ce mycélium est constitué par de longs hyphes plusieurs fois ramifiés. Ces hyphes naissent de chaque bactérie par bourgeonnement et sont très fragiles. Pour les obtenir et les voir clairement, il faut faire pousser les mycobactéries sur la même lame ou sur la même membrane de collodium qui servira pour l'observation optique ou électronique.

Summary. — The author describes the initial mycelium of *Mycobacteria*; such a mycelium is formed by long, pluri-branched hyphae. Such hyphae, which are very frail, reproduce by buddings of the bacteria. In order to obtain the hyphae and to see them clearly, *Mycobacteria* should be grown on the same slide or collodium membrane to be used for optical, or electronic observation.

Zusammenfassung. - Der Verfasser beschreibt das Anfangsmycelium der Mykobakterien, das aus mehrfach verzweigten langen Hyphae besteht. Diese Hyphae wachsen aus den einzelnen Bakterien heraus und sind sehr zerbrechlich und um sie einwandfrei zu erhalten und sehen zu können, müssen die Mykobakterien auf dem gleichen Objektträger und auf der gleichen Kollodium-Membran gezüchtet werden, die dann zur Beobachtung im Optischen- und im Elektronenmikroskop dient.

In tutti i comuni trattati di microbiologia si legge che i micobatteri sono privi di micelio o ne hanno uno del tutto rudimentale; la definizione del genere *Mycobacterium* data nel *Bergey's Manual of Determinative*

(*) Ricerche presentate al « Colloquium: Recent Research in Tuberculosis » - Strangeways Research Laboratory, Cambridge, 12-14 luglio 1954.

Bacteriology (1948) riassume appunto questo concetto: « *Mycelium rudimentary or absent, no spores formed. Acid fast* ».

In contrapposto al genere *Mycobacterium*, privo di micelio, gli AA. pongono il genere affine *Nocardia* che, sempre secondo il *Bergey's Manual*, avrebbe le caratteristiche di possedere un « *initial mycelium well developed, richly branching, dividing into rods and generally into cocci. Partially acid-fast* ».

L'origine di queste due affermazioni deriva sostanzialmente dalle due seguenti esperienze.

Se da una qualsiasi coltura di *Mycobacterium* noi prendiamo un'ansata di materiale, e la stemperiamo su vetrino, coloriamo ed osserviamo, noi troveremo sempre bastoncelli più o meno lunghi, più o meno curvi, più o meno clavati, più o meno coccoidi, ma non troveremo mai filamenti veri, miceli lunghissimi e ramificati.

Se da una qualsiasi coltura di così detta *Nocardia* noi prendiamo un'ansata di materiale, e la stemperiamo su vetrino, coloriamo ed osserviamo, noi troveremo — specie se la coltura è giovane — filamenti caratteristici, veri miceli provvisti di ramificazioni vere.

Queste due analoghe esperienze potrebbero sembrare probative e cruciali; eppure, se ben le analizziamo, esse ci mettono in evidenza non il reale aspetto dei germi nelle colonie, ma il loro aspetto dopo che la patina colturale venne sospesa in acqua, stemperata coll'ansa, strisciata sul vetrino; esse ci fanno perciò vedere germi traumatizzati, distaccati l'uno dall'altro da manualità tecniche che possono avere profondamente modificato l'aspetto miceliare dei germi ove i miceli di un gruppo fossero, per loro natura, più fragili di quelli dell'altro.

Per questo motivo noi siamo ricorsi ad altra tecnica, a una tecnica che ci permettesse di osservare i germi *in situ*, là, cioè, dove nacquero e si moltiplicarono, senza intervenire su di essi con manualità tecniche che ne alterassero i rapporti reciproci o menomassero la loro integrità.

Siamo perciò ricorsi alla tecnica studiata nel nostro Laboratorio da Princivalle (questi Rendiconti, 15: 294, 1952), tecnica che permette di ottenere intatte su vetrino portaoggetti microcolonie del germe in esame, evitando qualsiasi causa meccanica che possa alterarne i rapporti e la struttura.

Tale tecnica, com'è noto, consiste nel distendere nella metà inferiore di un vetrino portaoggetti, pulitissimo e sterile, una goccia di una sospensione diluitissima del microrganismo in esame, e d'introdurre il vetrino così preparato entro un capace provettone di vetro, contenente un appropriato terreno solido — disposto a becco di clarino —, e affondando il portaoggetti nel terreno stesso. Ai germi che si trovano lungo la super-

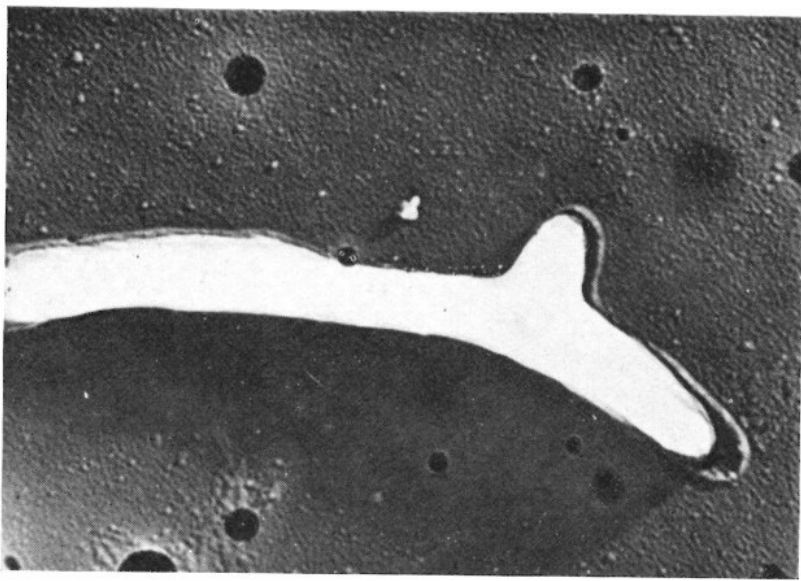


Fig. 1 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, ceppo Kirchberg (24.000 x).
Giovane gemma laterale (Preparato metallizzato).

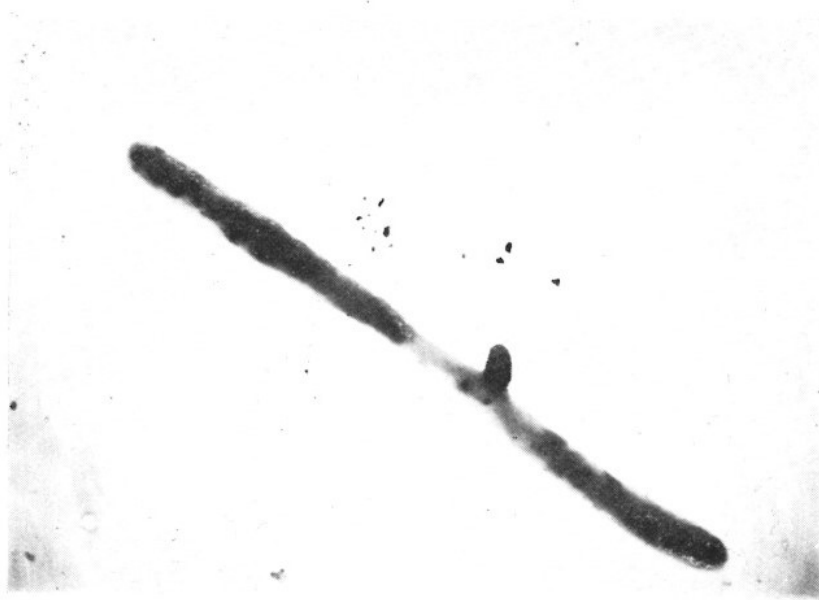


Fig. 2 - *Mycobacterium minetti* (18.000 x). Giovane gemma del tutto impermeabile ai raggi elettronici: notare la chiarificazione dei due tratti a monte e a valle della gemmazione.

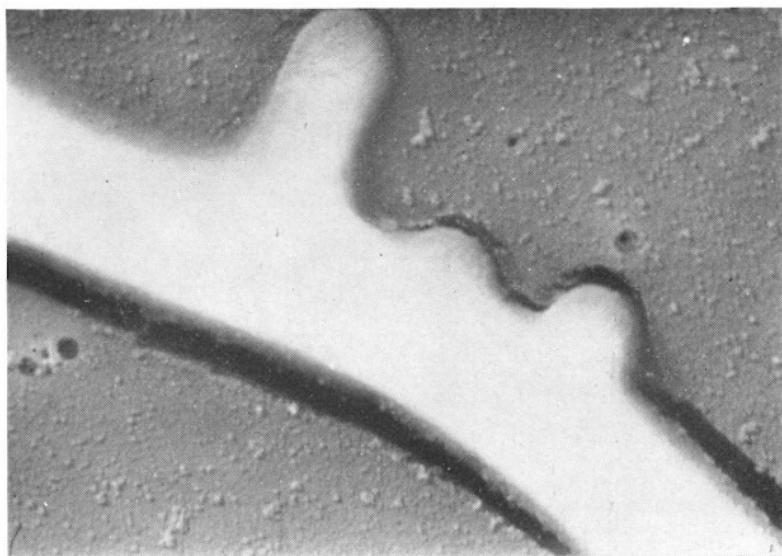


Fig. 3 - *Mycobacterium* sp. ceppo Pellegrino (30.000 x). Tre gemmazioni laterali (Preparato metallizzato).



Fig. 4 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, ceppo Kirchberg (20.000 x). Batterio con tre ramificazioni laterali (Preparato metallizzato).

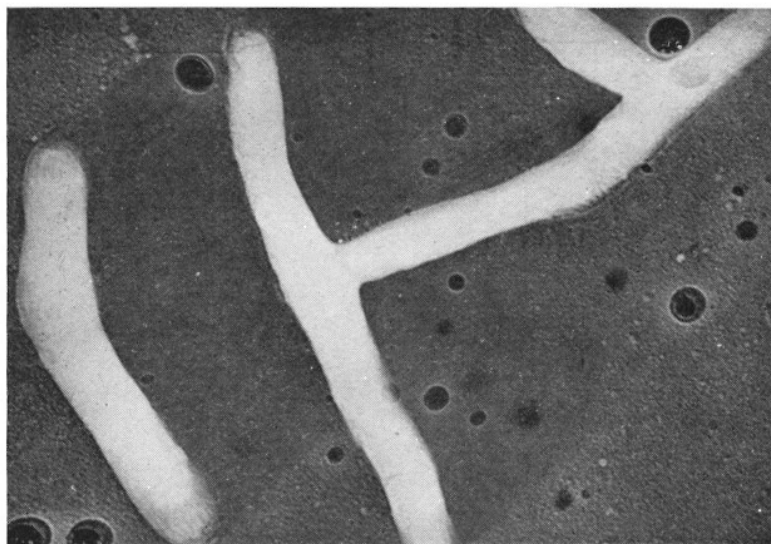


Fig. 5 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, ceppo Kirchberg (18.000 x). Batterio con ramificazione laterale dalla quale si diparte una ramificazione secondaria (Preparato metallizzato).

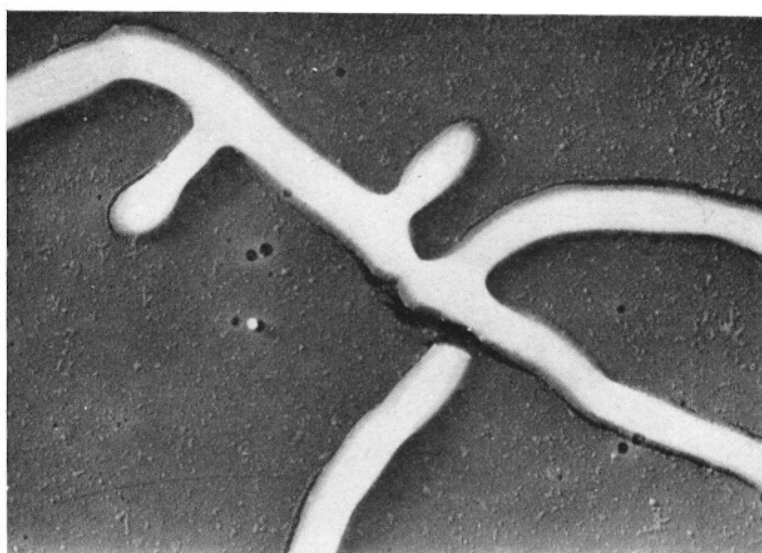


Fig. 6 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, ceppo Kirchberg (18.000 x). Ramificazioni multiple. Notare al centro una linea di rottura e in basso un bastoncino distaccato, l'estremità di questo ripete perfettamente la cavità lasciata sul micelio di fronte (Preparato metallizzato).

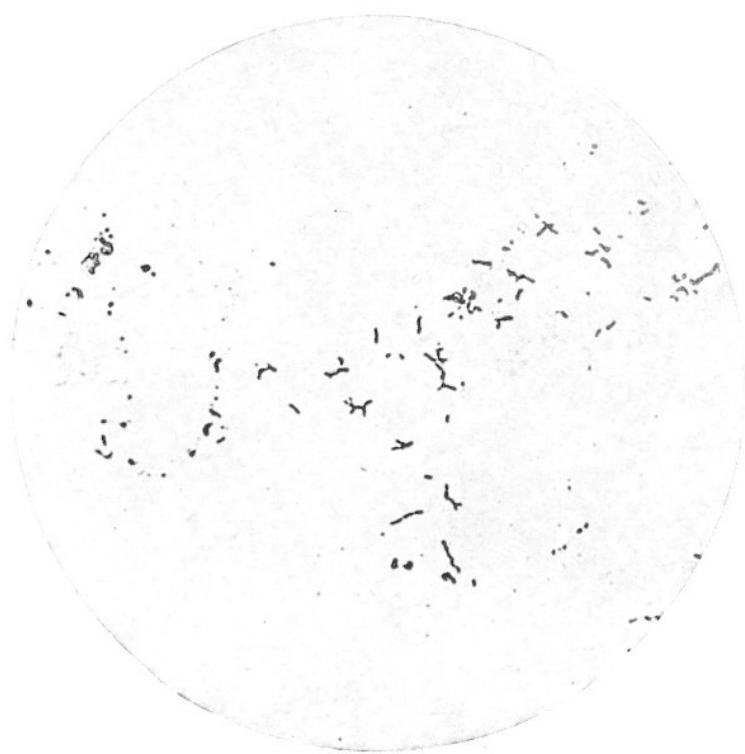


Fig. 7 - *Mycobacterium phlei*, ceppo Timoteo (400 x). Microcoltura di 12 ore: prime ramificazioni.

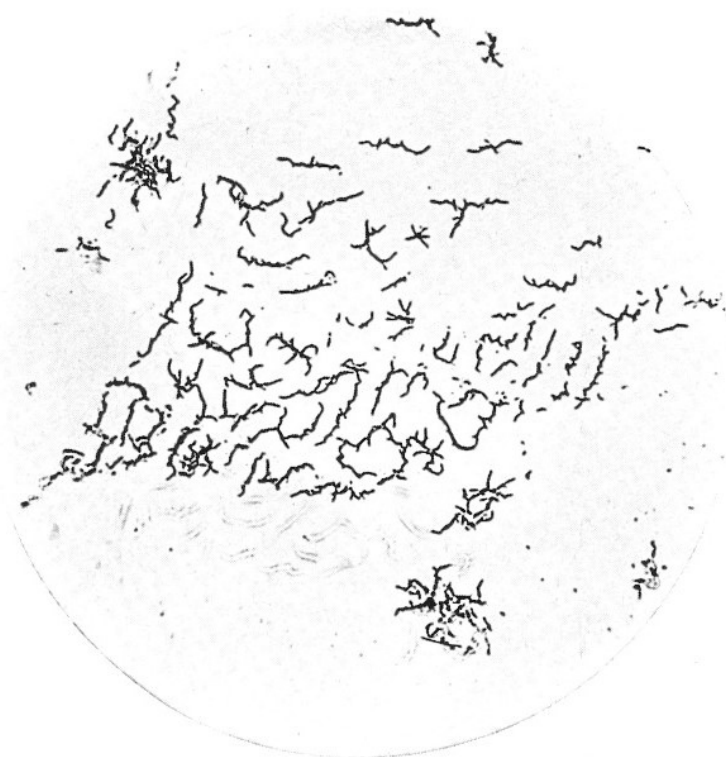


Fig. 8 - *Mycobacterium phlei* ceppo Timoteo (400 x). Microcoltura di 24 ore: i filamenti micelici si allungano e compaiono numerose ramificazioni secondarie.



Fig. 9 - *Mycobacterium phlei*, ceppo Timoteo (500 x). Microcoltura di 48 ore: il micelio è lunghissimo, si formano già alcuni cordoni; innumeri ramificazioni primarie e secondarie.

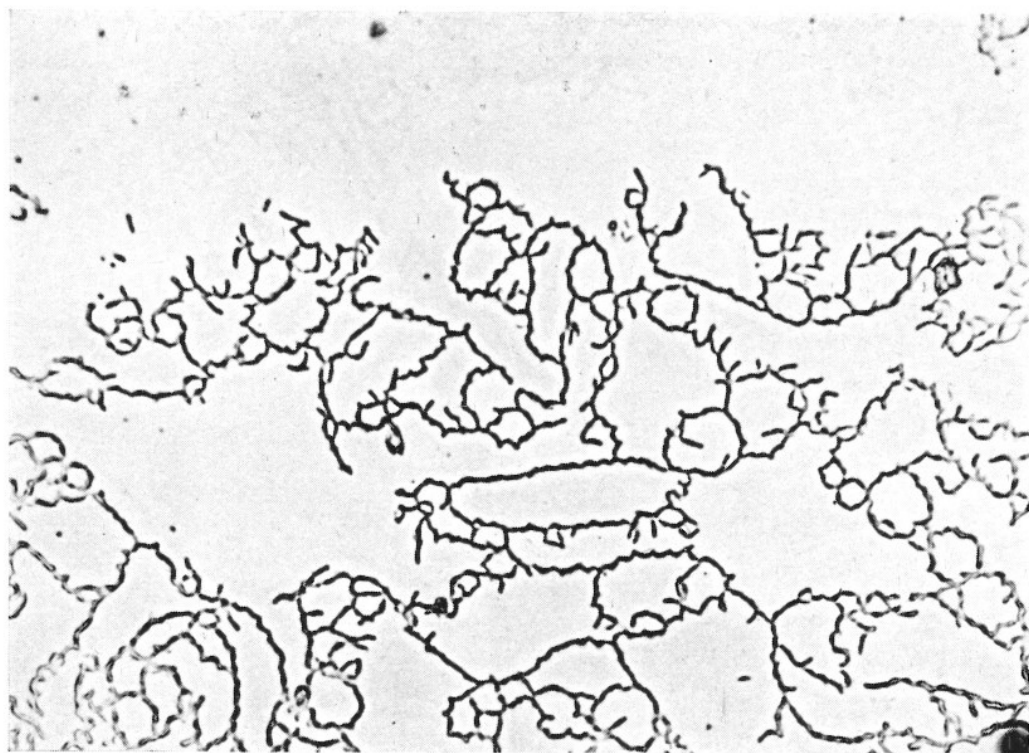


Fig. 10 - *Mycobacterium lacticola*, ceppo Milch (500 x). Microcoltura di 48 ore: il micelio ha assunto un aspetto reticolare; numerose ramificazioni primarie e secondarie.

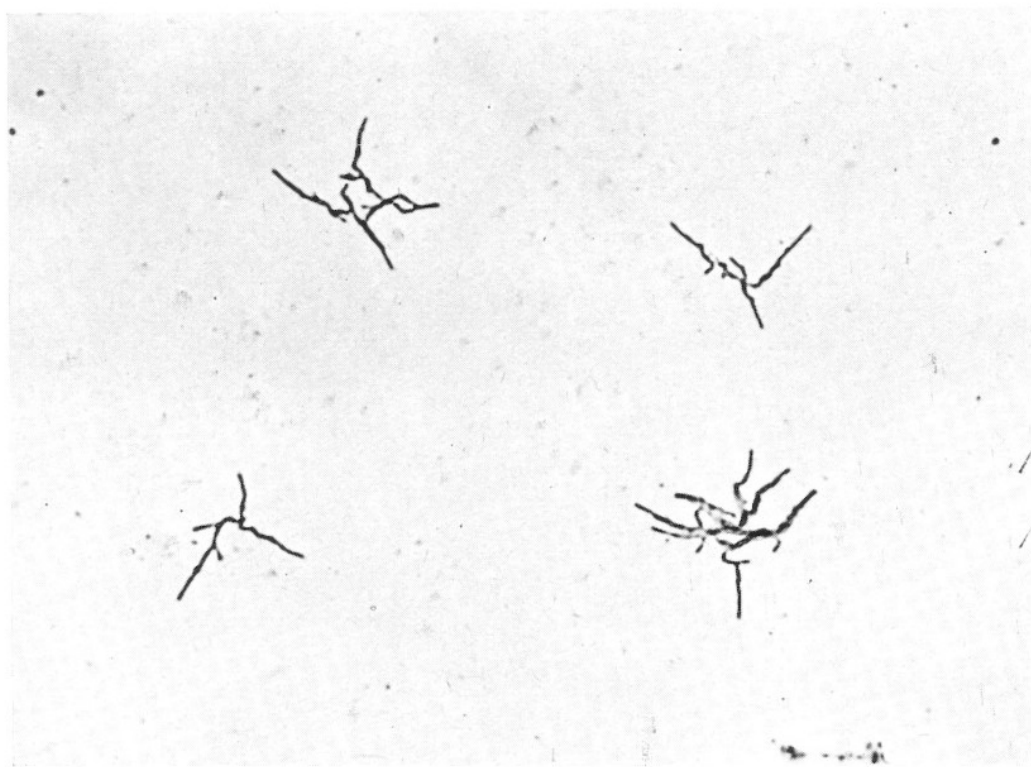


Fig. 11 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, ceppo Vallée (700 x). Microcoltura di 48 ore: micelio iniziale con ramificazioni primarie e secondarie; le colonie assumono un aspetto stellato.

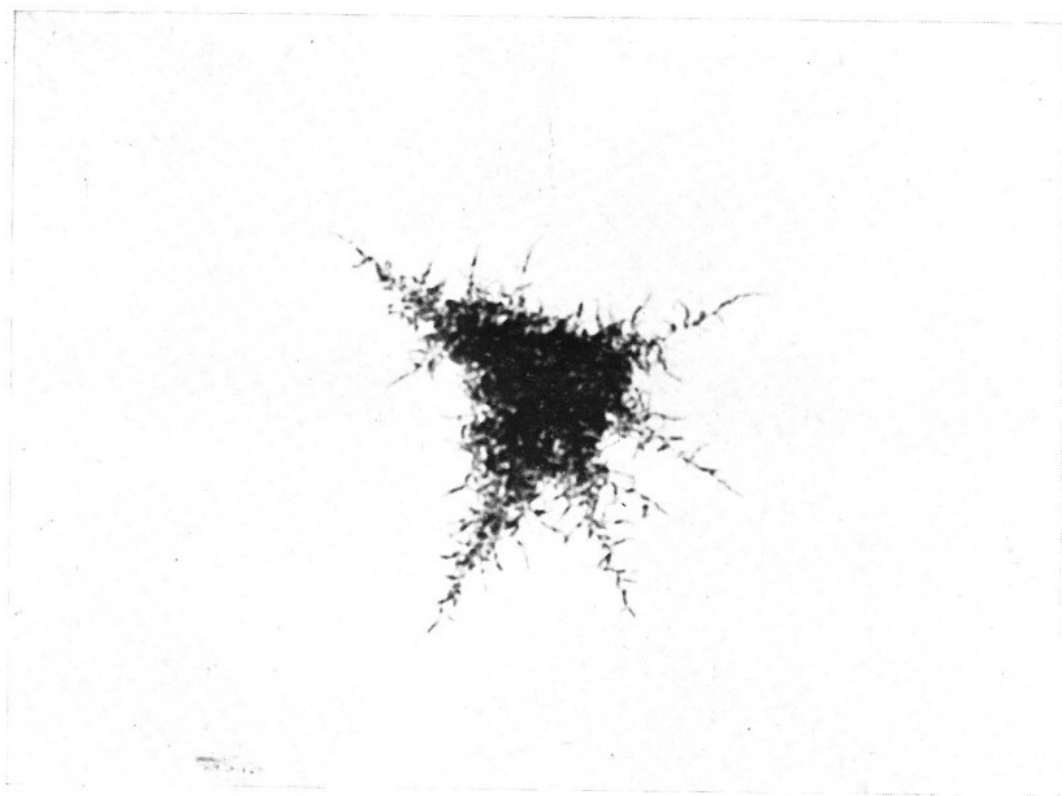


Fig. 12 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, ceppo Vallée (700 x). Microcoltura di 72 ore: colonia giovane, di forma stellare, con filamenti micelici nettamente ramificati.

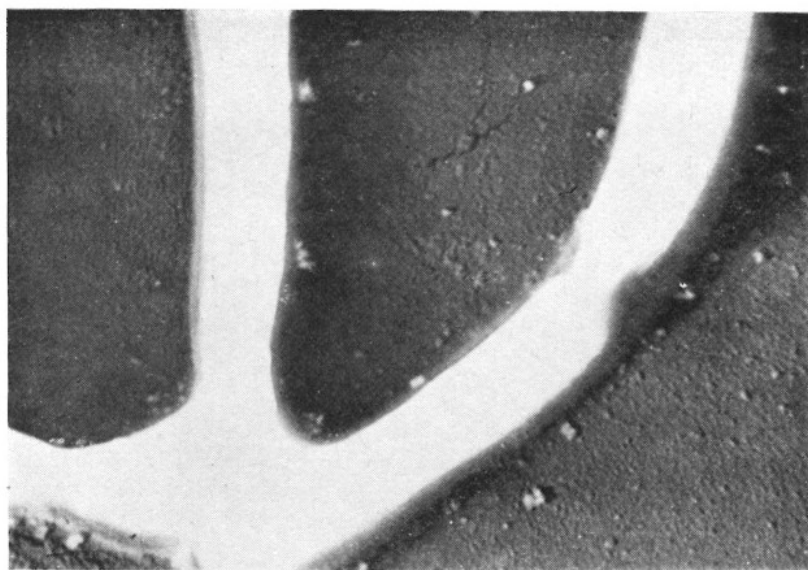


Fig. 13 - *Mycobacterium* sp. ceppo Pellegrino (18.000 x). Strozzatura proto-
plasmatica all'interno della parete miceliare (Preparato metallizzato).

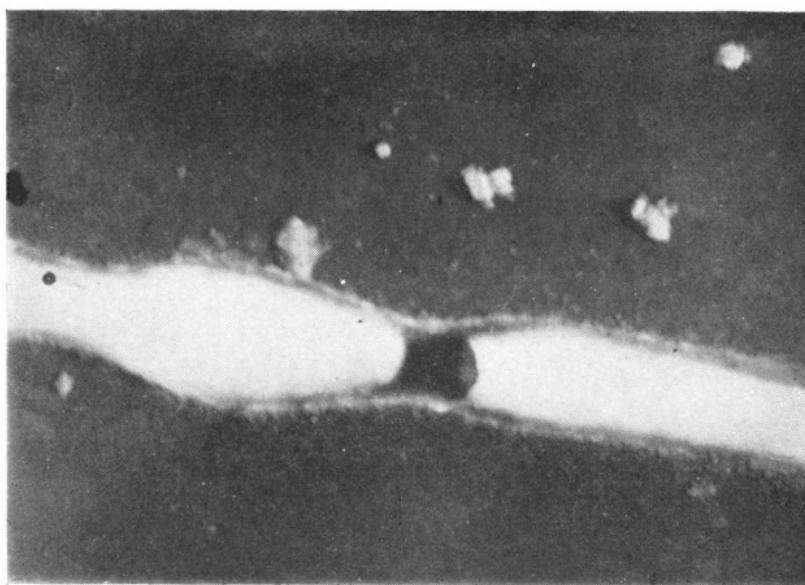


Fig. 14 - *Mycobacterium minetti*, ceppo cow 70 (18.000 x). Rottura del fila-
mento all'interno della parete miceliare (Preparato metallizzato).

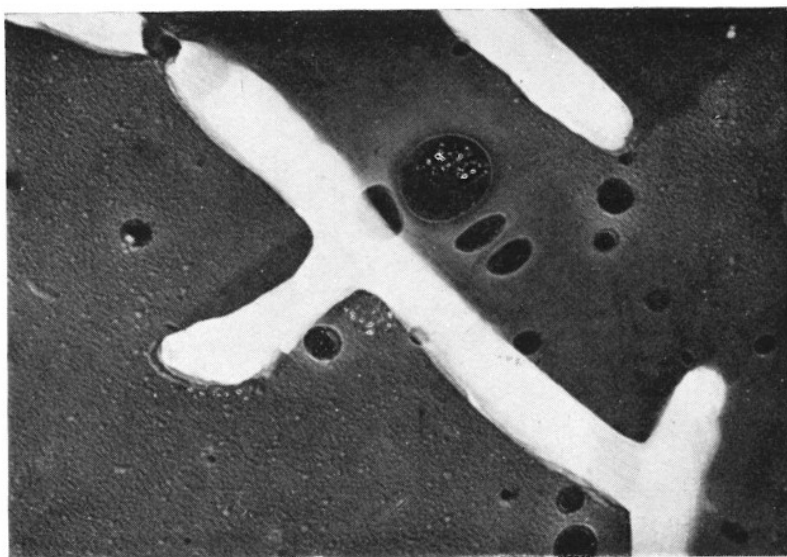


Fig. 15 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, ceppo Kirchberg (20.000 x). In alto a sinistra si osserva la rottura della parete miceliare là dove si è già operata la rottura del filamento interno (Preparato metallizzato).

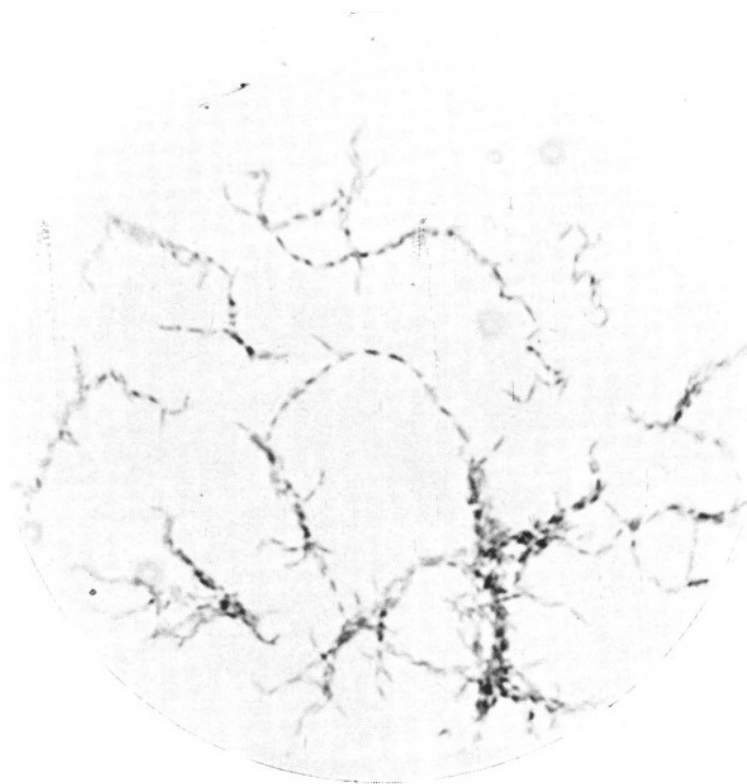


Fig. 16 - *Mycobacterium phlei*, ceppo Timoteo (1200 x). Filamenti costituiti da una membrana miceliare contenente i singoli batteri già formati e nettamente separati l'un dall'altro.

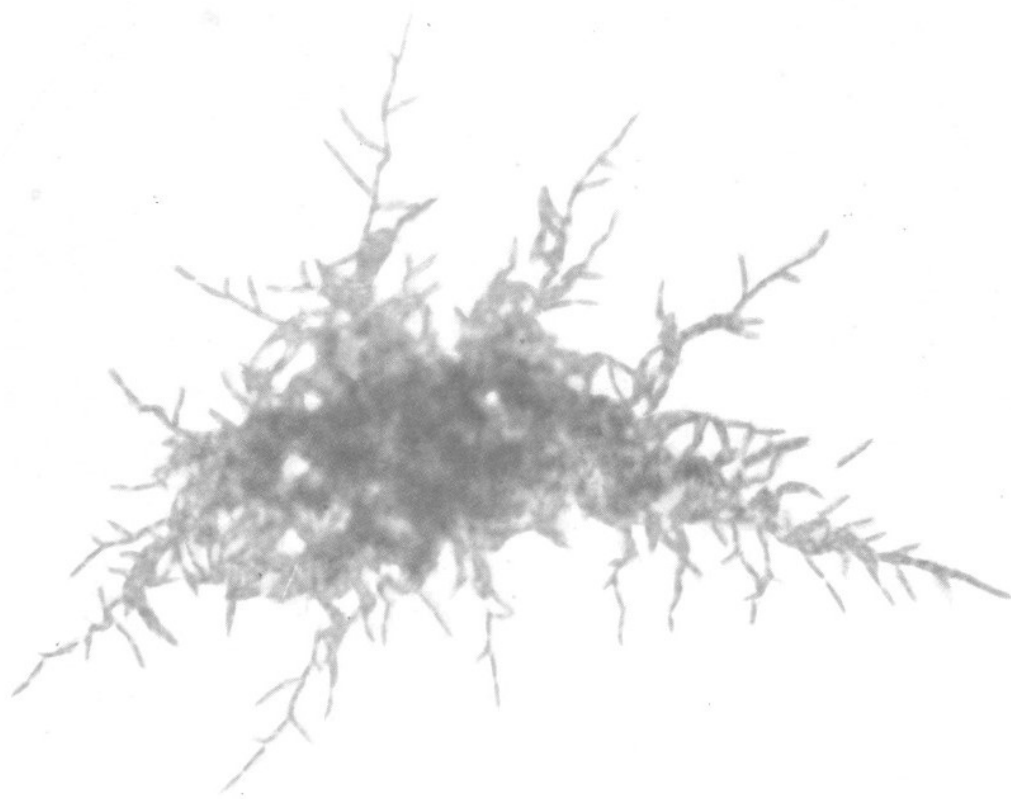


Fig. 17 - *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, ceppo Vallée (700 x). Microcolonia acidoresistente con ramificazioni a ramo di abete.

ficie del terreno arriva abbastanza nutrimento per dar loro la possibilità di vegetare. Alla distanza di tempo voluta si estraggono dal provettone i vetrini portaoggetti sui quali sarà possibile osservare direttamente lo sviluppo dei singoli germi seminati, senza che questi abbiano subito alcuno spostamento o siano stati sottoposti a manualità traumatizzanti. L'osservazione si potrà compiere a fresco o dopo fissazione e colorazione.

Non ci siamo accontentati di studiare i micobatteri al microscopio ottico, abbiamo voluto studiarli al microscopio elettronico impiegando, anche in questo caso, una tecnica che ci permettesse di studiare i germi così come essi realmente sono in coltura prescindendo da qualsiasi manipolazione successiva. Abbiamo perciò usato la tecnica di HILLIER J., KNAYSI G. e BAKER R. F. (*Jrn. Bact.* 56: 569, 1948), consistente nel coltivare i micobatteri sulla stessa membrana di collodio che, successivamente, servirà da supporto ai preparati elettronici, operando così in maniera tale da escludere nel miglior modo possibile di falsare i rapporti tra i singoli elementi microbici presenti in un campo microscopico o di traumatizzarli con complesse tecniche di lavaggio e centrifugazione.

Con l'impiego di tali metodi, noi siamo riusciti a seguire lo sviluppo anche di un singolo *Mycobacterium* dall'unità individuale alla complessa colonia, e abbiamo veduto come caratteristica costante di tutti i micobatteri — patogeni o no — sia la formazione di un micelio iniziale vero, molto allungato, nettamente ramificato e con ramificazioni primarie e secondarie.

Ecco come il fenomeno si avvera: dal bastoncello batterico si generano gemmazioni: una (fig. 1 e 2), due, tre (fig. 3 e 4) o più, provenienti da punti diversi della superficie batterica a volte sullo stesso piano trasverso — se pure diametralmente opposte —, a volte su piani diversi.

Tali gemmazioni sono dapprincipio piccolissime, appena proeminenti dalla superficie del cilindro batterico, poi a poco a poco si allungano e si prolungano. Le gemme di nuova formazione sono sì può dire impermeabili ai raggi elettronici (fig. 2), mentre la porzione di micobatterio che ha dato loro origine è molto trasparente, il che può far sospettare ch'esse siano ricche di acidi nucleinici passati dalla cellula madre alla gemma, acidi nucleinici che — com'è noto — sono poco trasparenti ai raggi elettronici.

Una volta formatasi la gemma, questa si prolunga rapidamente in un filamento sul quale nuove gemme si formano e nuove ramificazioni (fig. 5). Questo fatto è possibile osservarlo nelle diverse varietà umane, bovine e aviarie del bacillo tubercolare e in tutti gli altri micobatteri, patogeni o no.

Se le colture vengono lasciate in quiete, se le condizioni ambientali si prestano, le gemme dei micobatteri sono capaci di vegetare (fig. 7) prolungarsi (fig. 8) sino a dare lunghi filamenti (fig. 9), ramificantisi in maniera multipla e dando, a volte, aspetti caratteristici da specie a specie: i tubercolari veri, per esempio, si ramificano assumendo un aspetto stellare, dapprima semplice (fig. 11) e poi più complesso (fig. 12), sino a che le singole braccia della stella, assumono un aspetto di ramo d'abete (fig. 17). I miceli di altri micobatteri corrono, invece, dapprincipio più liberamente, nel senso che poco s'intrecciano tra loro e finiscono col disegnare reti a maglie irregolari (fig. 10), così, per esempio, il *Mycobacterium phlei* e il *Mycobacterium lacticola*. Queste reti finiranno col formare la trama su cui si formerà la futura colonia.

Più che le nostre parole, l'abbondante documentazione fotografica che alleghiamo al presente lavoro comprova le nostre affermazioni e illustra il fatto che noi denunciavamo.

Come si passa dalle forme miceliari alle forme a bastoncello? I miceli sono contenuti entro una parete miceliare all'interno della quale il micelio stesso si suddivide in segmenti: si cominciano a osservare semplici strozzature (fig. 13) che preludiano a una netta divisione (fig. 14). La parete miceliare si strozza a sua volta e finisce con lo spezzarsi (fig. 15) a dare vita a singoli elementi ognuno dei quali ha una sua parete cellulare. A volte è possibile osservare lunghi filamenti costituiti da una membrana miceliare contenente i singoli batteri già formati e nettamente separati l'un dall'altro; ciò si può facilmente porre in evidenza nel *Mycobacterium phlei* (fig. 16). Questi filamenti sono di una fragilità estrema, basta la minima manipolazione per spezzarli e separare l'un dall'altro gli elementi che li compongono.

I micobatteri hanno dunque un micelio iniziale nettamente definito e chiaramente visibile ove si eviti qualsiasi artefatto nell'allestimento dei preparati. Tale micelio si differenzia da quello di molte così dette Nocardie solo per il fatto di essere costantemente acido-resistente (fig. 17).

L'esistenza di questo micelio se da un lato pienamente giustifica la inclusione del genere *Mycobacterium* nell'ordine *Actinomycetales* BUCHANAN, dall'altro scuote dalle fondamenta la definizione classica dei generi *Mycobacterium* e *Nocardia* perchè con esso viene a mancare uno degli elementi creduti differenziali tra i due generi: l'esistenza o meno di un micelio iniziale.