

5. L. von LORCH, R. NEGRI. — Su di un nuovo terreno a base d'infuso di fegato e carota quale mezzo di coltura per vari microrganismi particolarmente esigenti.

Riassunto. — Viene descritto il terreno « carota-fegato » così composto: far bollire kg 1 di carote in l 1 di acqua di fonte, filtrare, portare a l 1 e aggiungere g 10 di peptone e g 5 di cloruro di sodio; mantenere a vapore fluente.

A una parte di questo estratto acquoso aggiungere una parte di estratto di fegato di bue così ottenuto: far bollire kg 1 di fegato in l 2 di acqua di fonte, filtrare, portare a l 2 e aggiungere g 20 di peptone e g 10 di cloruro di sodio; mantenere a vapore fluente. pH 6-7.

Distribuire, aggiungere eventualmente agar, sterilizzare per tindalizzazione. Questo terreno si è dimostrato idoneo per la coltura di: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus faecalis* e brucelle, nonché di numerosi microrganismi appartenenti a diverse famiglie di Schizomiceti e Miceti.

Résumé. — On fait la description du terrain « carote-foie » ainsi composé: faire bouillir 1 kg de carotes dans 1 litre d'eau de source, filtrer, reporter à 1 litre et ajouter 10 g de peptone et 5 g de chlorure de sodium; maintenir à vapeur courante.

A une partie de cet extrait aqueux ajouter une partie d'un extrait de foie de boeuf obtenu comme suit:

faire bouillir 1 kg de foie dans 2 litres d'eau de source, filtrer, reporter à 2 litres et ajouter 20 g de peptone et 10 g de Chlorure de sodium; maintenir à vapeur courante.

pH 6-7.

Distribuer, ajouter éventuellement de l'agar, stériliser par tyndallisation.

Ce terrain s'est montré favorable pour la culture de: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus faecalis* et brucelles; ainsi que de nombreux micro-organismes appartenant à diverses familles de Schizomycètes et Mycètes.

Summary. — The « liver-carrot » plate is made thus: Boil 1 kg carrots in 1 litre tap water, filter, make up to 1 litre and add 10 g peptone and 5 g sodium chloride; continue to simmer.

To one part of this aqueous extract add one part of ox liver extract obtained thus:

Boil 1 kg liver in 2 litres tap water, filter, make up to 2 litres and add 20 g peptone and 10 g sodium chloride; continue to simmer. pH 6-7.

Mix, add agar as required, and sterilize by Tyndalization.

This medium has been shown suitable for culturing: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus faecalis* and *Brucella* organisms, as well as many micro-organisms belonging to different families of the Schizomycetes and Mycetes.

Zusammenfassung. — Beschrieben wird der Leber-Karotten-Nährboden, der wie folgt hergestellt wird:

1 kg Karotten werden in einem Liter Frischwasser gekocht und filtriert, das Filtrat wird auf einen Liter gebracht und 10 g Pepton sowie 5 g Natriumchlorid hinzugefügt. Das Ganze wird in strömendem Dampf gelassen.

Pro Teil dieses wässrigen Extrakts wird ein Teil Rindsleberextrakt hinzugefügt, der in folgender Weise hergestellt wurde:

1 kg Leber wird in 2 l Frischwasser gekocht und filtriert, und das Filtrat auf 2 l gebracht. Hierauf werden 20 g Pepton und 10 g Natriumchlorid hinzugefügt und das Ganze in strömendem Dampf gelassen.

pH 6-7.

Das Gemisch wird gut verrührt, wobei u.U. Agar hinzugegeben wird, und dann mittels Tyndallisierung sterilisiert.

Dieser Nährboden erwies sich geeignet für Kulturen von *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus faecalis* und *Brucellae* sowie für zahlreiche Mikroorganismen, die zu den Familien der Schizomyceten und Myceten gehören.

La realizzazione del terreno di coltura, che è oggetto di questa nota, è sorta in un primo tempo dalla necessità di avere a disposizione un mezzo idoneo, per lo studio del *Lactobacillus bulgaricus*.

Note sono le difficoltà di isolare e coltivare detto lattobacillo: non sviluppa nei terreni ordinari, anche se in presenza di idrati di carbonio, poichè le sue richieste metaboliche necessitano fattori di crescita (vitami-

na B₁, B₂, PP, ecc.) che si trovano principalmente nel latte, negli infusi di malto, pomodoro, e nei terreni al lievito di birra.

Di un terreno al lievito di birra si è particolarmente interessato MAZARACCHIO (¹, ²), che ha rilevato come lo sviluppo del *Lactobacillus bulgaricus* su tale terreno non sia mai notevole, ma comunque superiore a quello ottenuto con agar-latte, agar-siero e agar-malto.

In questi ultimi anni sono entrati in uso, per lo studio dei lattobacilli e dei loro fattori di crescita, speciali terreni disidratati messi in commercio dalla Casa Difco; quelli abitualmente usati sono a base di agar-pomodoro [KULP, WHITE (³)], agar-tripsina, latte, latte peptonizzato [KULP, WHITE (³); KAYSER (⁴); ORLA-JENSEN (⁵); RETTGER, WEISS (⁶)], ecc.

Tali terreni, pur rispondendo bene per la coltura della maggior parte dei lattobacilli, non danno risultati soddisfacenti per quanto si riferisce al *Lactobacillus bulgaricus*.

Sulla stregua di dette conoscenze abbiamo creduto opportuno di studiare e preparare un terreno che rispondesse alle necessità, in fattori di crescita, legate al metabolismo del *Lactobacillus bulgaricus*. Pertanto la nostra attenzione si è rivolta particolarmente a quei composti organici di cui sono noti i principi attivi indispensabili al metabolismo batterico in genere.

Tra i numerosi tentativi eseguiti, gli estratti acquosi di fegato e di carota, con aggiunta di peptone e cloruro di sodio, hanno dato soddisfacenti risultati ai fini dell'isolamento e coltura del *Lactobacillus bulgaricus*. Questi risultati si possono attribuire alla composizione delle sostanze impiegate che risultano essere ricche delle vitamine idrosolubili: B₁, B₂, PP, B₆, H, acido pantotenico, inositolo, acido para-amino-benzoico, B₁₂, [MARGARIA (⁷); RONDONI (⁸); ROSENBERG (⁹)].

Come è noto tali vitamine rappresentano fattori di crescita necessari ai batteri, secondo il seguente meccanismo riportato schematicamente:

Vitamina B₁ o tiamina: la sua azione nella cellula batterica consiste nel partecipare, in qualità di coenzima, alla funzione della cocarbossilasi [OCHOA, PETERS (¹⁰)].

Vitamina B₂: funziona da coenzima in almeno nove enzimi trasportatori di idrogeno [GYÖRGY, KUHN, WAGNER-JAUREGG (¹¹); EULER, ADLER (¹²); KARRER, FREI, MEERWEIN (¹³); SNELL, STRONG (¹⁴); DOUDOROFF (¹⁵)].

Vitamina PP: l'acido nicotinico, o la sua amide, è il costituente strutturale indispensabile per l'attività del Coenzima I (difosfopiridin-nucleotide) e del Coenzima II (trifosfopiridin-nucleotide) [DANN (¹⁶); WARBURG (¹⁷); DIXON, ZERFAS (¹⁸); SNELL, STRONG, PETERSON (¹⁹)].

Vitamina B₆: come piridossal-fosfato partecipa a numerose reazioni di sintesi, degradazione (sia per decarbossilazione che deaminazione) e transaminazione di aminoacidi. In particolare la forma fosforilata della vitamina B₆, scarsamente attiva se somministrata nel mezzo ambiente, a causa dell'impermeabilità della membrana citoplasmatica, è indispensabile ad alcuni lattobacilli la cui membrana citoplasmatica, risulta permeabile a tale composto fosforilato (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, ecc.). [EDGAR, EL-SADR, MACRAE ⁽²⁰⁾; MÖLLER ⁽²¹⁾; WOODS ⁽²²⁾; LUNDE, KRINGSTAD ⁽²³⁾].

Vitamina H o biotina: sotto forma di nucleotide agisce come coenzima in alcune reazioni relative alla fissazione o liberazione di CO₂; catalizza inoltre la sintesi dell'acido oleico e aspartico. E' indispensabile per la crescita dei lattobacilli in particolare [WOODS ⁽²²⁾; KÖGL, VAN HASSELT ⁽²⁴⁾; ALLISON, HOOVER, BURK ⁽²⁵⁾].

Acido pantotenico: fa parte della molecola del Coenzima A, la cui azione consiste nel trasporto enzimatico dei gruppi acetile, formile, succinile, benzoile, ecc.. Molto probabilmente ciò ha grande importanza per l'ingresso di substrati nel sistema respiratorio terminale (WOODS ⁽²²⁾; WAISMAN, MICKELSEN, ELVEHJEM ⁽²⁶⁾].

Inositolo: interferisce sul metabolismo dei fosfolipidi e, pur venendo sintetizzato dalla flora batterica intestinale, si è dimostrato indispensabile quale fattore di crescita per altri microrganismi [WOLLEY ⁽²⁷⁾; LESH, UNDERKOFER, FULMER ⁽²⁸⁾; KÖGL, FRIES ⁽²⁹⁾].

Acido folico: rientra nel metabolismo degli acidi nucleici, ed in particolare delle basi puriniche, di certi aminoacidi, specie metionina, serina, ecc. Per la maggior parte dei lattobacilli è indispensabile la molecola integra di detto fattore di crescita (contiene anche acido para-amino-benzoico); per qualche altro lattobacillo (*Streptococcus faecalis*) è sufficiente una frazione di detta molecola (acido pteroico) [WOODS ⁽²²⁾; MITCHELL, SNELL, WILLIAMS ⁽³⁰⁾; SNELL, PETERSON ⁽³¹⁾; STOKSTAD ⁽³²⁾].

Acido para-amino-benzoico: la funzione di tale fattore di crescita si ricollega a quella dell'acido folico nella cui formula di struttura è compreso, perciò partecipa al metabolismo delle basi puriniche e di certi aminoacidi [WOODS ⁽²²⁾; DIMOND ⁽³³⁾; WIEDLING ⁽³⁴⁾; FILDES ⁽³⁵⁾].

Vitamina B₁₂: Fattore indispensabile per l'accrescimento dei lattobacilli (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmanii*, ecc.) e di molti altri batteri: la sua funzione sembra consistere nel permettere la sintesi degli acidi nucleici o dei loro composti; interviene anche nella sintesi della metionina [WOODS ⁽²²⁾; RICKES, BRINK, KONIUSZY, WOOD, FOLKERS ⁽³⁶⁾].

COMPOSIZIONE E PREPARAZIONE DEL TERRENO

1) *Infuso di carota*: a kg 1 di carote gialle ben lavate e triturate, aggiungere litri 1 di acqua di fonte; far bollire $3/4$ h. e filtrare per garza; riportare a volume (litri 1) e aggiungere 1% di peptone e 0,5% di cloruro sodico; mantenere a vapore fluente per 15 minuti.

2) *Infuso di fegato*: a kg 1 di fegato ben tritato di bue, aggiungere litri 2 di acqua di fonte; far bollire per 1 h. e filtrare per carta; riportare a volume (litri 2) e aggiungere 1% di peptone e 0,5% di cloruro sodico; mantenere a vapore fluente per 15 minuti.

Mescolare uguali volumi di infuso di carota e d'infuso di fegato, portare al pH desiderato (varia secondo i germi, vedi oltre); distribuire in provette e sterilizzare a vapore fluente per tre volte a distanza di 24 h.: primo giorno = 1h; secondo giorno = $3/4$ h.; terzo giorno = $3/4$ h.

Si ottiene così il terreno carota-fegato liquido.

Se si vuole ottenere il terreno carota-fegato solido, aggiungere l'1,5% (agar-molle) o il 2% di agar e operare come la preparazione dell'agar comune.

Nella preparazione del terreno si è avuto cura di non superare i 100° C. di temperatura, onde evitare il più possibile la degradazione delle vitamine idro-solubili contenute negli estratti.

La concentrazione idrogenionica finale, per l'optimum di sviluppo del *Lactobacillus bulgaricus* e dei lattobacilli in genere è quella di pH 6, per gli altri microrganismi pH 7.

CARATTERISTICHE DI SVILUPPO DEL LACTOBACILLUS BULGARICUS

Nel terreno liquido lo sviluppo si rivela già dopo 24 h. dalla semina con lieve intorbidamento del mezzo; dopo 48 h. si ha il massimo di sviluppo, che si manifesta con intenso ed uniforme intorbidamento. Nei giorni successivi si rileva notevole deposito batterico sul fondo della provetta, fino alla completa chiarificazione del mezzo sovrastante. L'esame microscopico mette in evidenza elementi batterici morfologicamente differenti da quelli che si rilevano nelle colture in latte: il lattobacillo tende ad ingrossarsi e allungarsi in modo abnorme.

Nel terreno solido si ha sviluppo di colonie simil-carbonchiose che si evidenziano già dopo 24 h. dalla semina.

IMPIEGO DEL TERRENO PER LA COLTURA DI ALTRI MICRORGANISMI

Confortati dai risultati ottenuti con la coltura del *Lactobacillus bulgaricus*, che come è noto ha particolari esigenze di crescita, abbiamo voluto provare detto terreno su microrganismi appartenenti alle seguenti famiglie: *Lactobacteriaceae*, *Parvobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Aspergillaceae*, *Cephalosporiae*, *Phialophoreae*, *Botrytideae*, *Sporotricheae*, *Eremascaceae*, *Eremascaceae Imperfectae*, *Tuberculariaceae*, *Gymnoascaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycetaceae Imperfectae*, *Trichophytoneae*, *Toruleae*, *Stilbaceae*, *Endomyceae*, *Mucoraceae*, *Ashbyaceae*.

Lo sviluppo dei ceppi coltivati è risultato molto rapido e abbondante.

Degno di particolare attenzione è stato il comportamento dello *Streptococcus faecalis*, di cui sono note le caratteristiche di sviluppo (colonie poco apparenti di aspetto puntiforme e rugiadiforme, non confluenti, sui comuni terreni solidi; intorbidamento in 24 h, e sedimentazione alquanto viscosa successivamente, in quelli liquidi).

Sul terreno carota-fegato detto germe si sviluppa in meno di 24 h, dando una patina abbondantissima sul terreno solido, intorbidamento intenso e uniforme sul terreno liquido.

Uno sviluppo con caratteristiche di cui sopra è particolarmente utile per alcune ricerche, specie per la titolazione biologica della tirotricina che, in tal caso, si può anche effettuare con la tecnica standard dell'agar-germi.

Di notevole rilievo è stato anche il comportamento delle brucelle: rapido e abbondante sviluppo, rilevabile anche dopo 12 h. per la *Brucella bronchiseptica*, e 24 h. per le altre specie. Il terreno ha permesso inoltre il mantenimento delle caratteristiche di specie: in un anno di subcolture di un congruo numero di ceppi, non si sono riscontrate variazioni, in particolare della fase.

Per quanto riguarda i miceti, possiamo segnalare il loro rapido (24-48 h.) e abbondante sviluppo, con costanza delle caratteristiche di specie, in particolare dei pigmenti.

CONCLUSIONI

Il terreno carota-fegato sopra descritto è risultato essere un mezzo colturale idoneo per un grande numero di microrganismi appartenenti a diverse famiglie di Schizomiceti e Miceti.

Per i risultati ottenuti, per il basso costo e la facile preparazione, lo si segnala quale terreno di abituale impiego in laboratorio, per particolari ricerche ove occorra ottenere rapido e abbondante sviluppo batterico e, in specie, per la coltura del *Lactobacillus bulgaricus*, dello *Streptococcus faecalis* e delle brucelle.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) MAZZARACCHIO V. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 2: 861 (1939).
- (2) MAZZARACCHIO V. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 11: 1528 (1948).
- (3) KULP R., WHITE J. - Science, 76: 17 (1932).
- (4) KAISER A. - Ann. Inst. Pasteur, 8: 737 (1894).
- (5) ORLA-JENSEN - Centr. Bakt., II Abt., 4: 196 (1898).
- (6) RETTGER J., WEISS J. E. - J. Bact., 28: 501 (1934).
- (7) MARGARIA R. - Ed. C.E.A., Milano, 393 (1947).
- (8) RONDONI P. - Ed. Unione Tipografico-Editrice Torinese - Torino, 323 (1935).
- (9) ROSENBERG H. R. - Ed. Interscience Publ., New York, 99-153-197-219-253-275-283-469 (1945).
- (10) OCHOA S., PETERS R. A. - Biochem. J., 32: 1501 (1938).
- (11) GYÖRGY P., KUHN R., WAGNER R., JAUREGG T. - Z. Physiol. Chem., 223: 21 (1934).
- (12) EULER H. V., ADLER E. - Z. Physiol. Chem., 223: 105 (1934).
- (13) KARRER P., FREI P., MEERWEIN H. - Helv. Chim. Acta, 20: 79 (1937).
- (14) SNELL E. E., STRONG F. M. - Enzymologia, 6: 186 (1939).
- (15) DOUDOROFF M. - Enzymologia, 5: 239 (1938).
- (16) DANN W. J. - Science, 86: 616 (1937).
- (17) WARBURG O. - Ergeb. Enzymforsch., 7: 240 (1937).
- (18) DIXON M., ZERFASS L. G. - Biochem. J., 34: 371 (1940).
- (19) SNELL E. E., STRONG F. M., PETERSON W. H. - J. Am. Chem. Soc., 60: 2825 (1938).
- (20) EDGAR C., ELSADR M., MACRAE T. - Biochem. J., 32: 2225 (1938).
- (21) MÖLLER E. T. - Z. Physiol. Chem., 254: 285 (1938).
- (22) WOODS D. D. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 16: 44 (1934).
- (23) LUNDE G., KRINGSTAD H. - Biochem. J., 32: 708 (1938); 32: 712 (1938).
- (24) KÖGL F., VAN HASSELT W. - Z. Physiol. Chem., 243: 189 (1936).
- (25) ALLISON F. E., HOOVER S. R., BURK D. - Science, 78: 217 (1933).
- (26) WAISMAN H. A., MICKELSEN O., ELVEHJEM C. A. - J. Nutrition, 17: 269 (1939).
- (27) WOLLEY W. - J. Bact., 43: 5 (1942).
- (28) LESH J., UNDERKOFER L., FULMER E. - J. Am. Chem. Soc., 60: 2505 (1938).
- (29) KÖGL F., FRIES N. - Z. Physiol. Chem., 249: 93 (1937).
- (30) MITCHEL H., SNELL E., WILLIAMS R. - J. Am. Chem. Soc., 63: 2284 (1941).
- (31) SNELL E. E., PETERSON W. H. - J. Bact., 39: 273 (1940).
- (32) STOKSTAD E. L. R. - J. Biol. Chem., 139: 475 (1941).
- (33) DIMOND N. S. - Science, 94: 420 (1941).
- (34) WIEDLING S. - Science, 94: 389 (1941).
- (35) FILDES P. - Lancet, 238: 955 (1940).
- (36) RICKES E., BRINK N., KONIUSZY F., WOOD T., FOLKERS K. - Science, 108: 634 (1948).