

13. Littoria von LORCH, G. DE FELIP, M. EL ZOFRI. — **Studio morfologico di alcuni lattobacilli e delle loro mutanti resistenti agli antibiotici.**

Riassunto. — Gli AA. hanno eseguito uno studio morfologico comparativo, al microscopio elettronico, di alcuni stipiti di lattobacilli e delle loro mutanti antibiotico-resistenti. Gli stipiti presi in considerazione sono: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis* e le loro mutanti a resistenza indotta alla penicillina, tetracicline, cloranfenicolo. E' stato evidenziato, a carico delle mutanti bastoncellari, che la resistenza alla penicillina determina aumento del volume cellulare, mentre la resistenza al cloranfenicolo si accompagna a coartazione ed irregolare distribuzione della massa citoplasmatica. La resistenza alle tetracicline permette di evidenziare formazioni endocitoplasmatiche, in concomitanza con il processo di divisione cellulare. Tali formazioni possono venire rilevate anche nei ceppi originari, mediante la colorazione metacromatica di Albert.

Gli AA. hanno inoltre osservato, al microscopio elettronico, un probabile « ciclo di sviluppo » del *Lactobacillus bifidus*.

Résumé. — Les auteurs ont effectué, avec le microscope électronique, une étude morphologique comparative, de quelques souches de lactobacilles et de leurs mutants résistants aux antibiotiques. On a examiné ainsi les souches suivantes: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis* et leurs mutants devenus résistants à la pénicilline, aux tétracyclines et au chloramphénicol. En ce qui concerne les mutants à bâtonnet, on a mis en évidence que la résistance à la pénicilline détermine un'augmentation du volume cellulaire, tandis que la résistance au chloramphénicol est accompagnée par la coartation et par une distribution irrégulière de la masse cytoplasmatique. La résistance aux tétracyclines permet de mettre en évidence des formations endocytoplasmatiques, reliées aux processus de division cellulaire. Ces formations peuvent être retrouvées aussi dans les souches originaires par le moyen de la coloration méta-chromatique d'Albert.

Les auteurs ont observé, en outre, toujours avec le microscope électronique, un « cycle de développement » probable du *Lactobacillus bifidus*.

Summary. — The authors have carried out a comparative morphological study with the electron microscope, of some strains of *Lactobacillus* and their antibiotic-resistant mutants. The strains taken into consideration are: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, and *Streptococcus lactis* and their mutants with induced resistance to penicillin, tetracyclin and chloramphenicol. It has been shown, for the rod-cell mutants, that the resistance to penicillin causes increase of the cell volume, while the resistance to chloramphenicol is accompanied by coarctation and irregular distribution of the cytoplasmatic mass. The resistance to tetracyclin shows endocyttoplasmatic formations, concurrent with the process of cell division. Such formations may also be noticed in the original strains, using Albert's metachromatic staining method.

The authors have also observed with the electron microscope, a probable « development cycle » of the *Lactobacillus bifidus*.

Zusammenfassung. — Die Verfasser haben am Elektronenmikroskop ein vergleichendes Studium einiger Stämme von Laktobakteriens und ihrer antibiotikaresistenten Mutanten durchgeführt. In dem Studium wurden folgende Stämme berücksichtigt: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis* und ihre Penizillin, Tetracyclin und Cloramphenikol resistent gewordenen Mutanten. In den Mutanten mit stabförmigen Zellen wurde erwiesen, dass die Penizillinresistenz eine Zunahme des Zellenvolumens bewirkt, während die Cloramphenikolresistenz von Koartation und unregelmässiger Verteilung der zytoplasmatischen Masse begleitet ist. Die Tetracyclinresistenz gestattet endozytoplasmatische Bildungen, die mit dem Zellteilungsprozess zusammenfallen, zum Vorschein zu bringen. Solche Bildungen können auch in den Ursprungsstämmen mit Hilfe der metachromatischen Färbung von Albert festgestellt werden.

Die Verfasser haben ausserdem am Elektronenmikroskop einen wahrscheinlichen « Entwicklungszyklus » des *Lactobacillus bifidus* beobachtet.

In questi ultimi anni sono state condotte numerose ricerche al fine di evidenziare eventuali modificazioni del comportamento biochimico, sierologico e patogenetico delle mutanti antibiotico-resistenti di diversi microrganismi [FLOREY e JENNINGS (1); MILLER e BONHOFF (2, 3) KLEIN

KIMMELMAN ⁽⁴⁾; MURRAY e coll. ⁽⁵⁾; MIDDLEBROOK e YEGIAN ⁽⁶⁾; MILLER e BONHOFF ⁽⁷⁾; SCHNEIERSON ⁽⁸⁾].

Non risulta invece che siano stati compiuti studi relativi ad eventuali alterazioni morfologiche indotte dall'antibiotico-resistenza.

Ci è sembrato pertanto interessante tale problema e, avendo nella nostra collezione stipiti di lattobacilli e loro mutanti a resistenza indotta agli antibiotici, abbiamo creduto opportuno eseguire uno studio morfologico comparativo di questi microrganismi onde poter rilevare eventuali alterazioni delle strutture cellulari. Ciò in quanto l'analisi delle proprietà biochimiche e colturali non aveva mostrato modificazioni del comportamento delle mutanti rispetto ai ceppi originari.

MATERIALI E METODI.

Gli stipiti di lattobacilli presi in considerazione sono stati: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis* e loro mutanti a resistenza indotta alla penicillina, tetracicline e cloranfenicolo.

Le mutanti antibiotico-resistenti sono state ottenute con tecnica analoga a quella già applicata da uno di noi [von LORCH ⁽⁹⁾].

Tale tecnica consiste nel graduale adattamento degli stipiti batterici in terreno elettivo o in latte scremato contenente dosi crescenti di antibiotico. Il grado di resistenza ottenuto è del seguente ordine: penicillina 10 U/cm³, tetracicline 100 γ /cm³; cloranfenicolo 100 γ /cm³.

Le colture per l'osservazione al microscopio elettronico ed ottico, sono state eseguite in brodo carota-fegato pH 6 [von LORCH e NEGRI ⁽¹⁰⁾] per i ceppi originari e brodo carota-fegato pH 6, addizionato dell'antibiotico alla dose massima di resistenza, per le mutanti.

Lo studio morfologico è stato condotto su brodocolture incubate a 37° C. Per l'osservazione al microscopio elettronico le cellule batteriche sono state lavate ripetutamente (5-6 volte) mediante centrifugazione in soluzione fisiologica. Le sospensioni così ottenute, messe su membrana di collodio ed essiccate, sono state sottoposte al processo di metallizzazione.

La spirale metallizzante era di cromo e le cellule erano esposte ai raggi molecolari, ad un angolo di incidenza di 30°, per 1-2 minuti.

Le osservazioni al microscopio elettronico sono state eseguite a 10.000 diametri.

Le osservazioni al microscopio ottico ($\times$ 1.500), sono state effettuate su cellule lavate in soluzione fisiologica e sottoposte a colorazione metacromatica di Albert.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.

Nello studio morfologico comparativo dei lattobacilli e delle loro mutanti antibiotico-resistenti si è innanzitutto rilevato, quale carattere generale, un aumento delle dimensioni a carico delle mutanti bastoncellari. Infatti le mutanti antibiotico-resistenti del *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *L. bifidus* si presentano, al microscopio elettronico, aumentate nei loro diametri, con prevalenza a volte, del longitudinale o del trasverso.

Accanto a tale caratteristica di ordine generale, si è notato, a carico delle mutanti bastoncellari cloranfenicolo-resistenti, una coartazione del citoplasma batterico con netta evidenza della membrana cellulare.

Tali caratteri, costanti in tutte le mutanti dei lattobacilli, possono essere esaltati in qualche specie, ad esempio, nelle mutanti del *L. bifidus* e *L. acidophilus*.

Il fenomeno di coartazione e distacco delle membrane cellulari mette in evidenza una non uniforme distribuzione della massa citoplasmatica, i cui margini risultano irregolarmente seghettati.

Le alterazioni morfologiche sopra citate rivestono un carattere generale, in quanto sono state messe in evidenza in tutte le mutanti bastoncellari prese in considerazione.

A carico di alcune mutanti antibiotico-resistenti, sono invece stati possibili rilievi particolari.

Tali alterazioni si riferiscono alla comparsa, in seno al citoplasma, di formazioni sferoidali irregolari per numero e disposizione, non permeabili ai raggi elettronici.

Esse sono state da noi evidenziate al microscopio elettronico nelle mutanti del *L. lactis* e *L. acidophilus* resistenti alle tetracicline e penicillina.

Nello studio morfologico al microscopio ottico degli stessi stipiti e delle loro mutanti, mediante colorazione di Albert, queste formazioni endocitoplasmatiche sono state rilevate anche nel *L. lactis*, *L. acidophilus*, e *L. bifidus*. (Vedi fotografie n. 21, 22, 23).

Il fatto che al microscopio elettronico tali formazioni si siano notate nelle mutanti antibiotico resistenti, ma non nei ceppi originali, fa pensare che l'induzione della resistenza influisca sulla massa citoplasmatica rendendola più permeabile ai raggi elettronici. E' così possibile la dimostrazione di queste formazioni, meno permeabili, in seno al citoplasma.

Il metodo di Albert, che elettivamente colora i granuli metacromatici, ricchi in metafosfati, permette di porre in risalto tali sferule endocitoplasmatiche anche in alcuni stipiti originari.

Formazioni analoghe sono state descritte da vari AA. in micobatteri, in corinebatteri e in alcuni germi Gram negativi [DARDANONI e ZAFFIRO ⁽¹¹⁾; Bosco ⁽¹²⁾]. Sul loro significato sono state formulate varie ipotesi: secondo MUDD ⁽¹³⁾ si tratterebbe di mitocondri; secondo BRINGMANN ⁽¹⁴⁾ di carioidi batterici; per BISSET ⁽¹⁵⁾, infine, sarebbero centri citoplasmatici di accrescimento.

Circa l'interpretazione da parte nostra di queste formazioni endocitoplasmatiche, evidenziate in parte con artifici di tecnica (colorazione ed induzione di resistenza), siamo propensi a ritenerle in stretta relazione con il processo di divisione, come risulta dall'analisi delle fotografie (Vedi fotografie n. 3, 7). Tale processo infatti, è risultato, alle nostre osservazioni, in coincidenza con le formazioni endocitoplasmatiche.

Da quanto riportato si può concludere che la resistenza alla penicillina determina aumento del volume cellulare, mentre la resistenza al cloranfenicolo si accompagna ad una coartazione e irregolare distribuzione della massa citoplasmatica. La resistenza alle tetracicline permette, invece, di evidenziare, anche al microscopio elettronico, formazioni endocitoplasmatiche presenti nei punti di divisione cellulare.

Nulla si è rilevato a carico delle mutanti antibiotico-resistenti dello *Streptococcus lactis*.

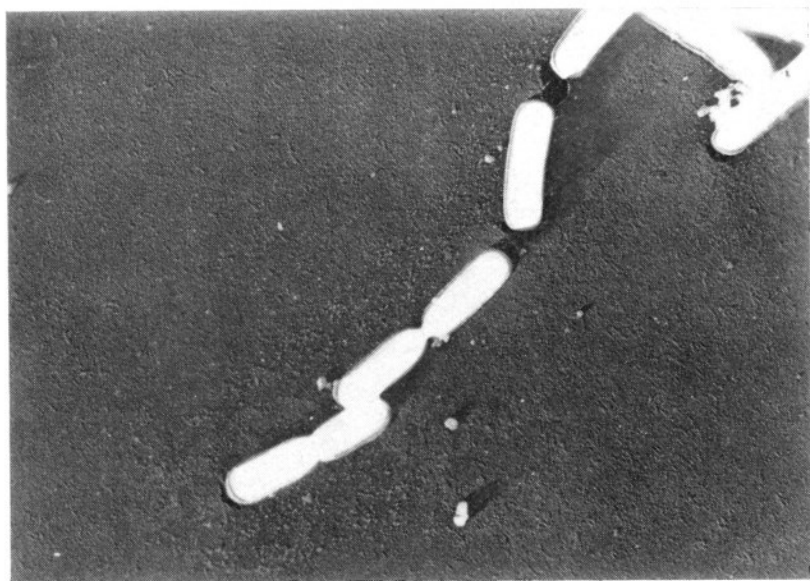
Nel corso di dette ricerche è stato altresì possibile rilevare quanto GYLLENBERG ha notato, con osservazioni al microscopio ottico, a carico del *L. bifidus*. Questo autore ha descritto, accanto alla nota morfologia « bifida », caratteristica di tale lattobacillo, formazioni coccoidi provenienti da filamenti rigonfiati. Queste formazioni coccoidi darebbero origine a nuove brevi cellule bastoncellari.

La nostra indagine, al microscopio elettronico, ha confermato quanto notato da GYLLENBERG e ha permesso inoltre di intravedere un probabile « ciclo di sviluppo » del *L. bifidus*.

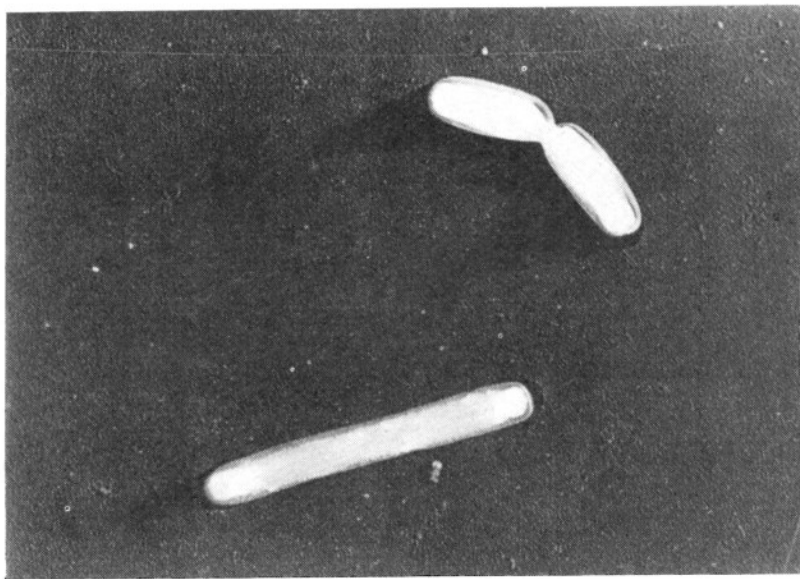
Di tale ciclo è stato possibile distinguere tre fasi (Vedi schema).

Nella prima fase, osservabile in colture di 3 ore, si nota la presenza di brevi elementi bastoncellari accanto a elementi allungati che presentano accenni di ramificazione (Vedi fotografia n. 13). Nelle colture di 6 ore, le ramificazioni sono bene evidenti e assumono, in genere, disposizione dicotomica (Vedi fotografia n. 14).

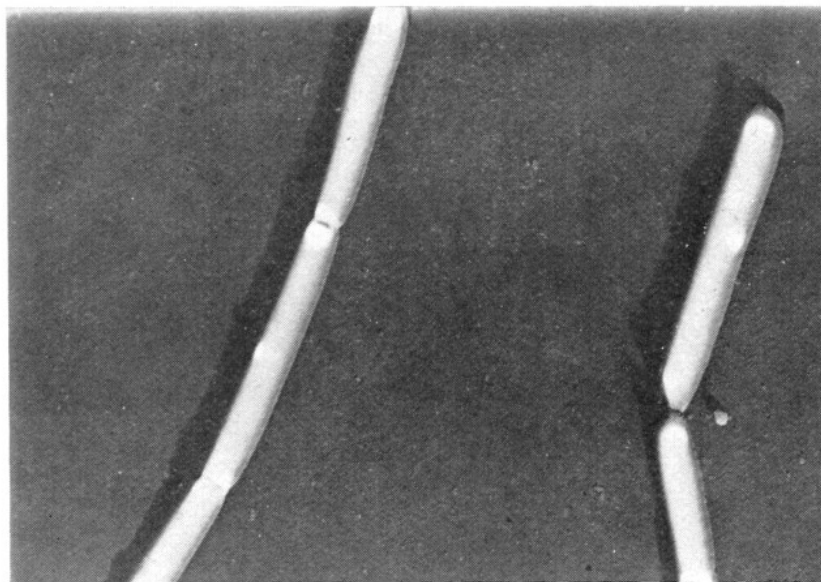
Nella seconda fase, che si può rilevare in colture di 12-24 ore, gli elementi con ramificazioni in atto, presentano delle strozzature terminali (formazioni a « birillo »), che daranno luogo a corpi coccoidi liberi (Vedi fotografie n. 15, 16).



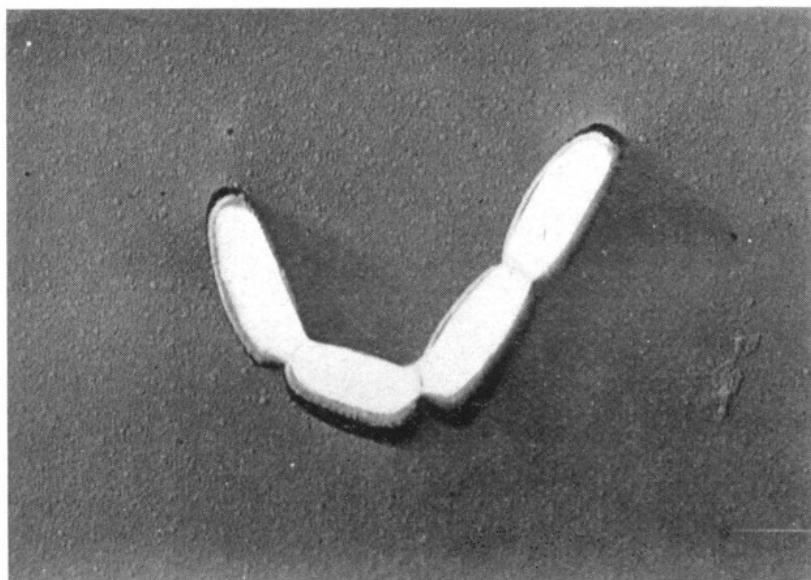
Fot. 1. - *Lactobacillus lactis* da una brodocoltura di 12 ore: elementi in divisione, a citoplasma compatto e membrana cellulare evidente. ($\times 10.000$).



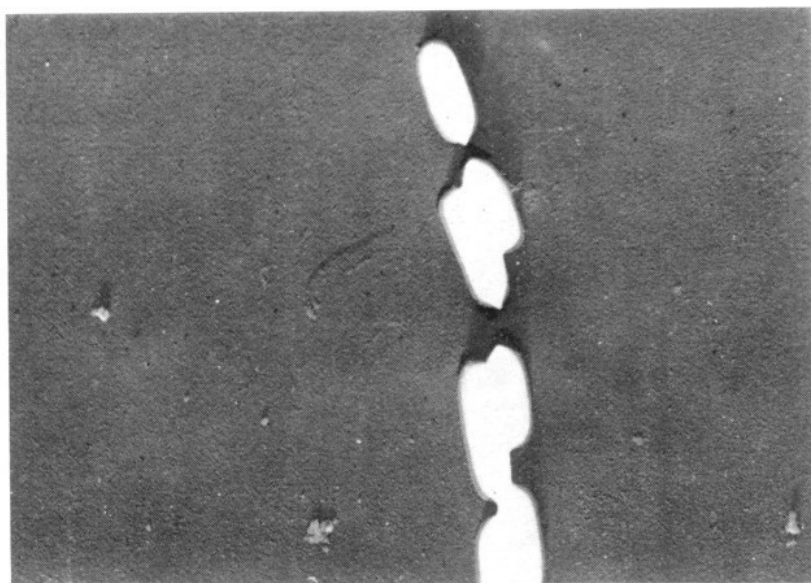
Fot. 2. - *Lactobacillus lactis*, mutante a resistenza indotta alla penicillina, da una brodocoltura di 12 ore: notasi aumento dei diametri rispetto a quelli dello stipite originario (Fot. 1). In una cellula si nota aumento del diametro longitudinale, mentre le altre due cellule presentano aumento del diametro trasversale. Nell'elemento allungato, il citoplasma si presenta non omogeneamente distribuito, con netto addensamento ai poli. La parete cellulare è ben evidente in tutti gli elementi. ($\times 10.000$).



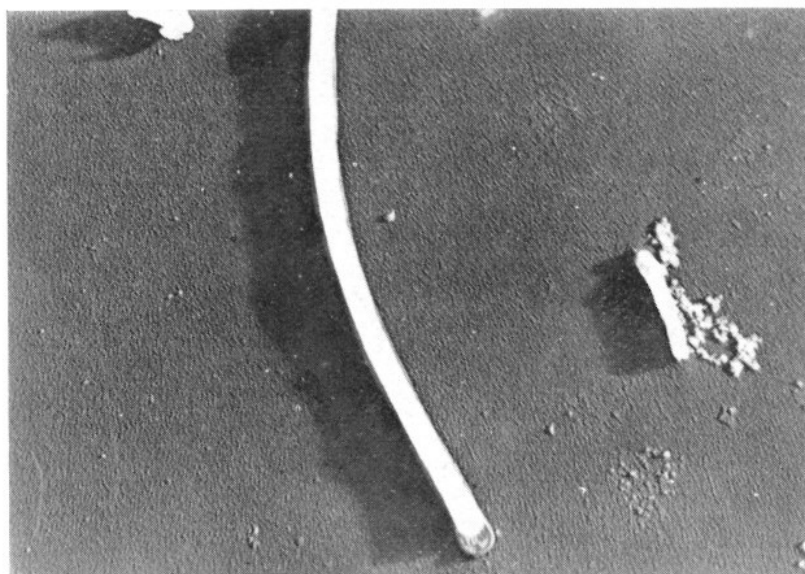
Fot. 3. - *Lactobacillus lactis*, mutante a resistenza indotta alle tetracicline, da una brodocoltura di 12 ore: elementi allungati, a citoplasma poco compatto; presenza di sferule endocitoplasmatiche, debordanti dal restante corpo batterico e scarsamente trasparenti ai raggi elettronici. Notasi la concomitanza di dette sferule con le aree di divisione. ($\times 10.000$).



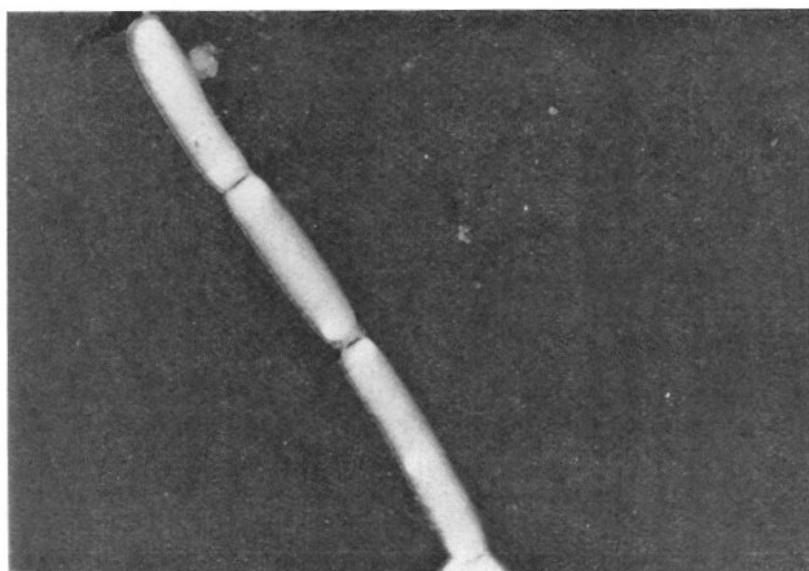
Fot. 4. - *Lactobacillus lactis*, mutante a resistenza indotta al cloranfenicolo, da una brodocoltura di 12 ore: elementi in divisione, a protoplasma compatto e nettamente distaccato dalla parete cellulare. ($\times 10.000$).



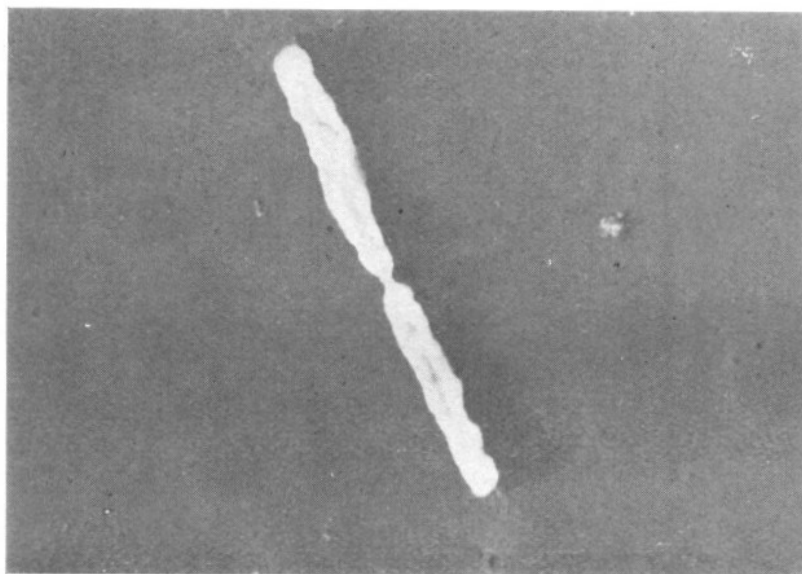
Fot. 5. - *Lactobacillus acidophilus* da una brodocoltura di 12 ore: elementi a protoplasma compatto e membrana cellulare evidente. ($\times 10.000$).



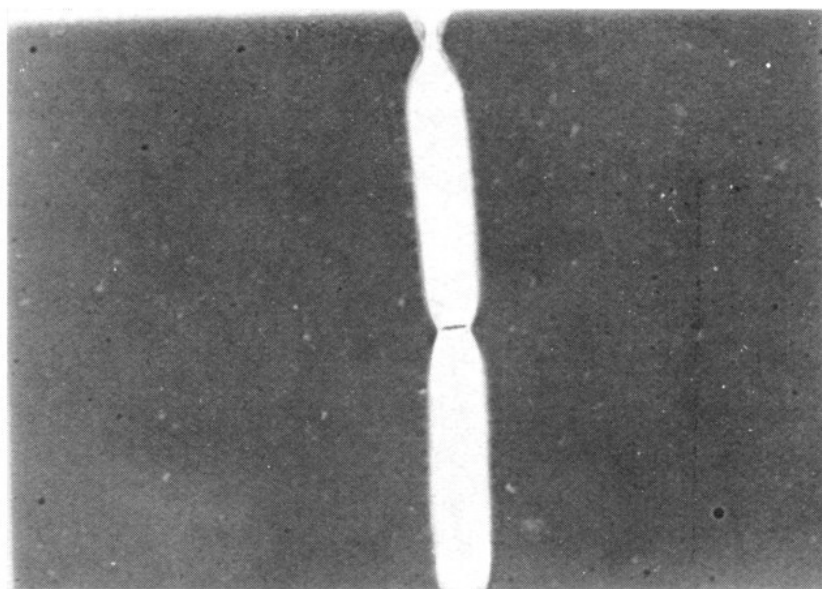
Fot. 6. - *Lactobacillus acidophilus*, mutante a resistenza indotta alla penicillina, da una brodocoltura di 12 ore: elemento cellulare notevolmente aumentato nel suo diametro longitudinale; notasi retrazione del citoplasma al polo. ($\times 10.000$).



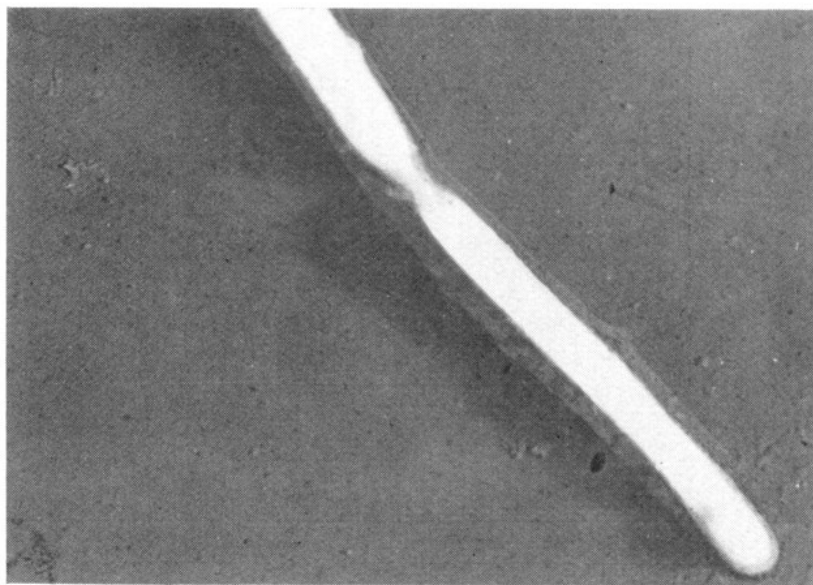
Fot. 7. - *Lactobacillus acidophilus*, mutante a resistenza indotta alle tetraciline, da una brodocoltura di 12 ore: elementi in divisione, a citoplasma poco omogeneo; notasi la presenza di sferule endocitoplasmatiche, nettamente evidenti nell'aree di divisione cellulare. ($\times 10.000$).



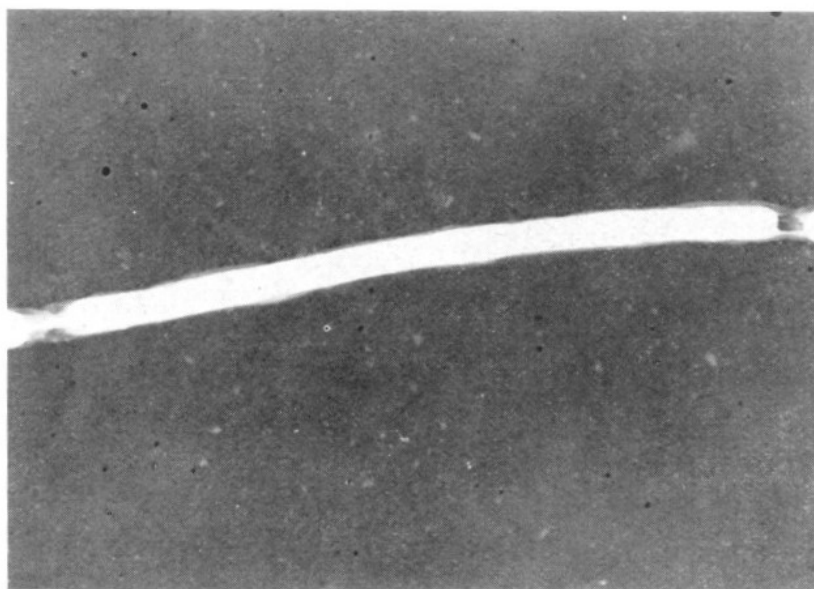
Fot. 8. - *Lactobacillus acidophilus*, mutante a resistenza indotta al cloranfenicolo, da una brodocoltura di 12 ore: elementi a citoplasma non uniformemente distribuito e coartato. I margini delle cellule si presentano irregolarmente seghettati. ($\times 10.000$).



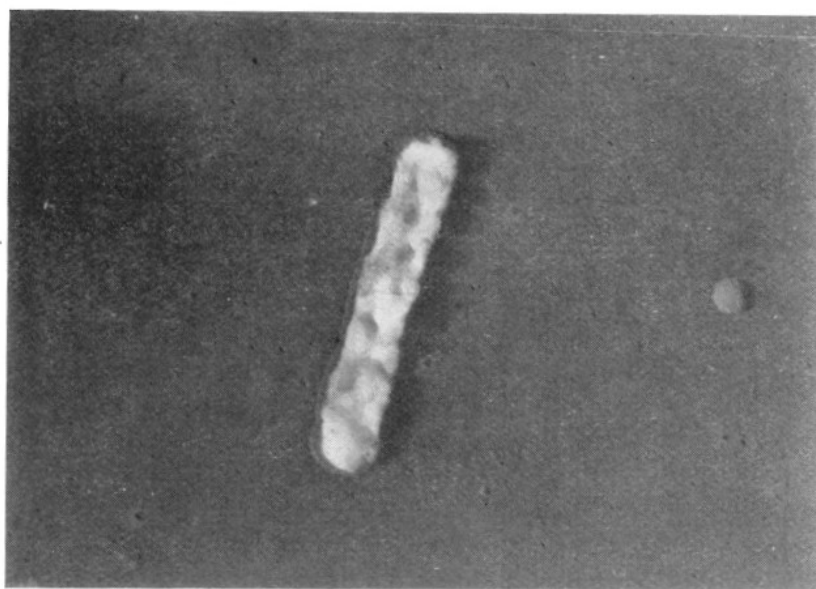
Fot. 9. - *Lactobacillus bulgaricus*, da una brodocoltura di 12 ore: elementi in divisione con membrana cellulare evidente. ($\times 10.000$).



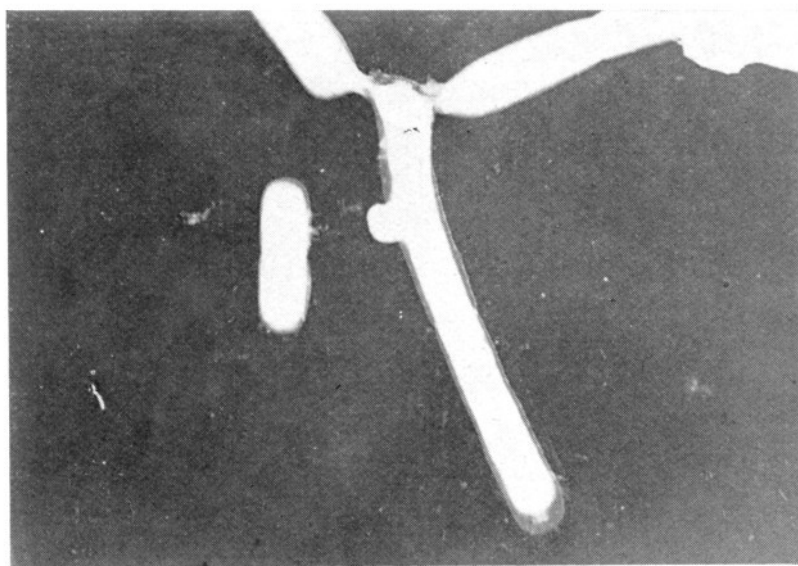
Fot. 10. - *Lactobacillus bulgaricus*, mutante a resistenza indotta alla penicillina, da una brodocoltura di 12 ore: elementi con aumentato diametro longitudinale. Evidenti la parete cellulare e la membrana citoplasmatica. ($\times 10.000$).



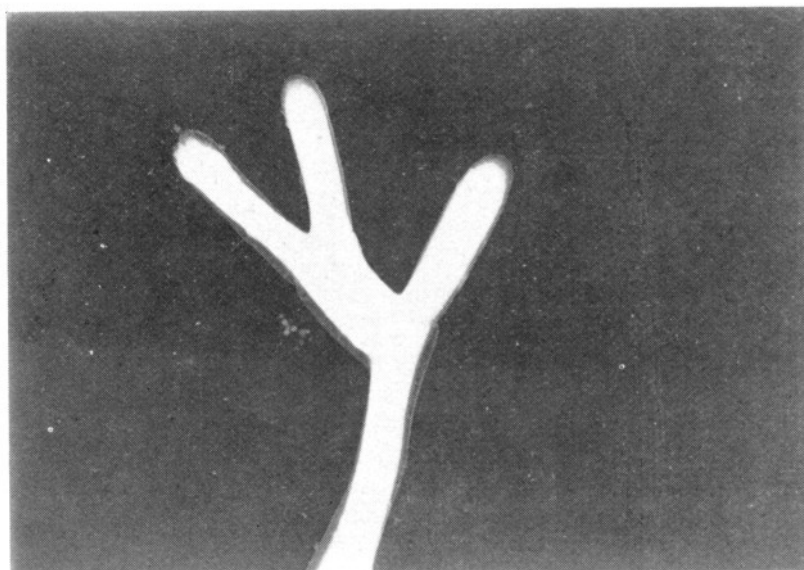
Fot. 11. - *Lactobacillus bulgaricus*, mutante a resistenza indotta alle tetracine, da una brodocoltura di 12 ore: elemento allungato, a citoplasma compatto. La membrana batterica è evidente ai poli della cellula, ove si notano formazioni a lacinia. ($\times 10.000$).



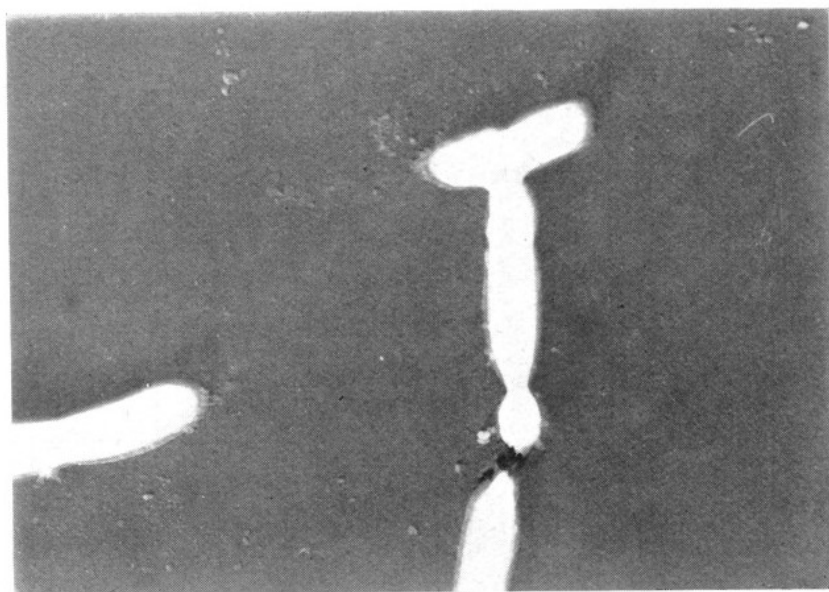
Fot. 12. - *Lactobacillus bulgaricus*, mutante a resistenza indotta al cloranfenicolo, da una brodocoltura di 12 ore: elementi a citoplasma coartato e disposto in ammassi. ($\times 10.000$).



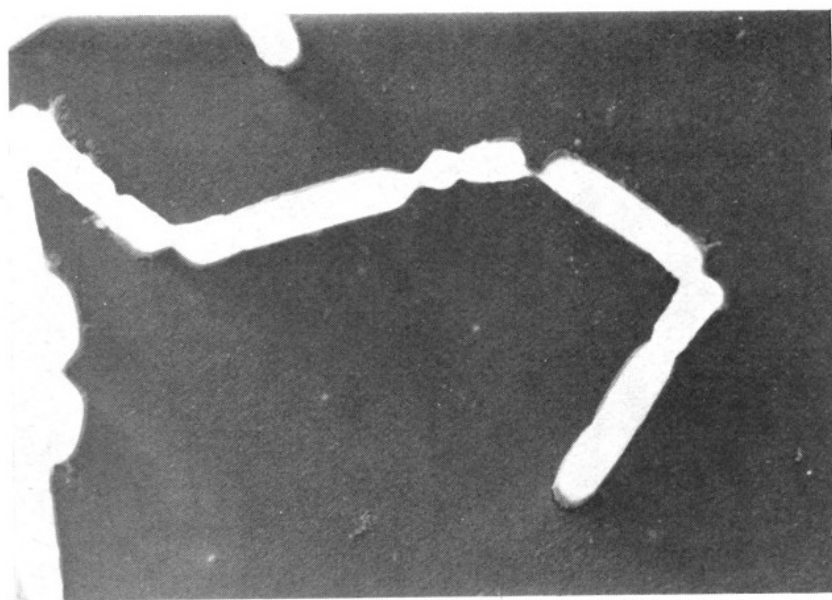
Fot. 13. - *Lactobacillus bifidus* da una brodocoltura di 3 ore (I fase del ciclo di sviluppo): elementi bastoncellari di varia lunghezza a citoplasma compatto e parete cellulare evidente. Nell'elemento centrale notasi l'inizio di ramificazioni. ($\times 10.000$).



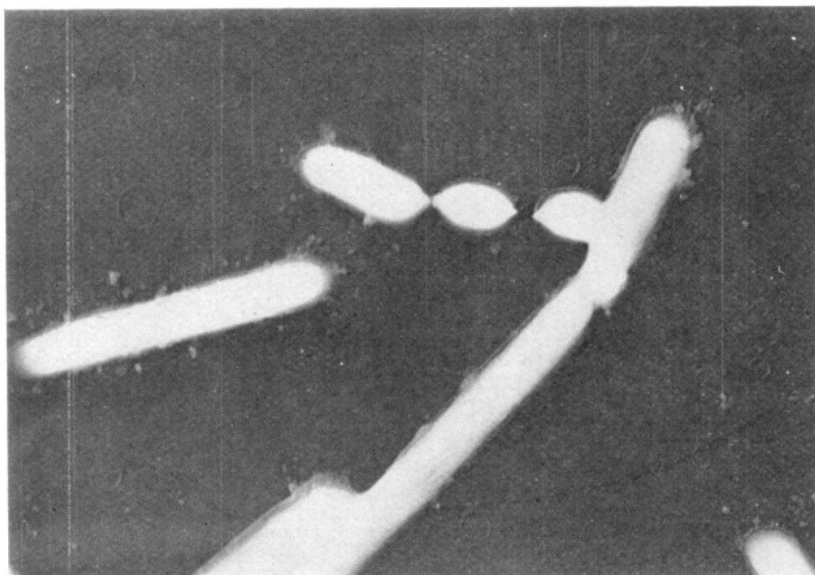
Fot. 14. - *Lactobacillus bifidus* da una brodocoltura di 6 ore (I fase del ciclo di sviluppo): elemento con triplice ramificazione, a citoplasma compatto e parete cellulare evidente. ($\times 10.000$).



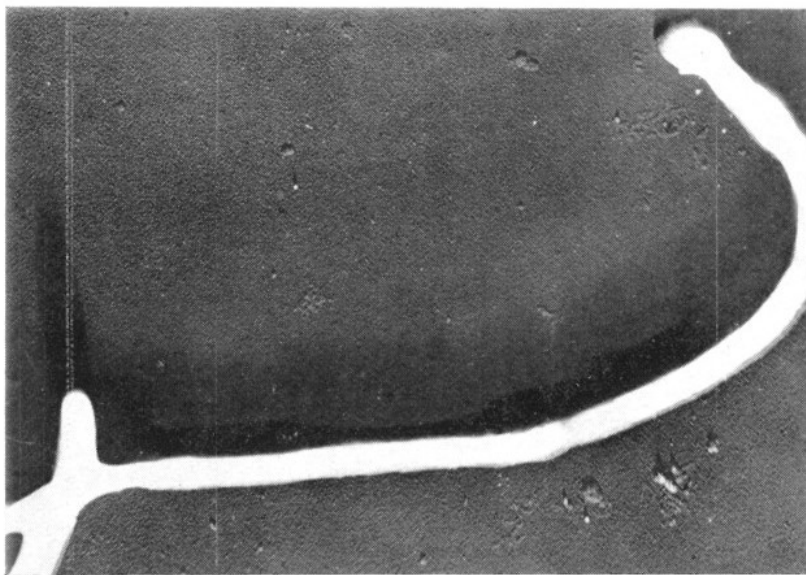
Fot. 15. - *Lactobacillus bifidus* da una brodocoltura di 12 ore (II fase del ciclo di sviluppo): elemento a « birillo » in cui si rileva l'inizio del processo di divisione che darà luogo alla formazione di un corpo coccoide. ($\times 10.000$).



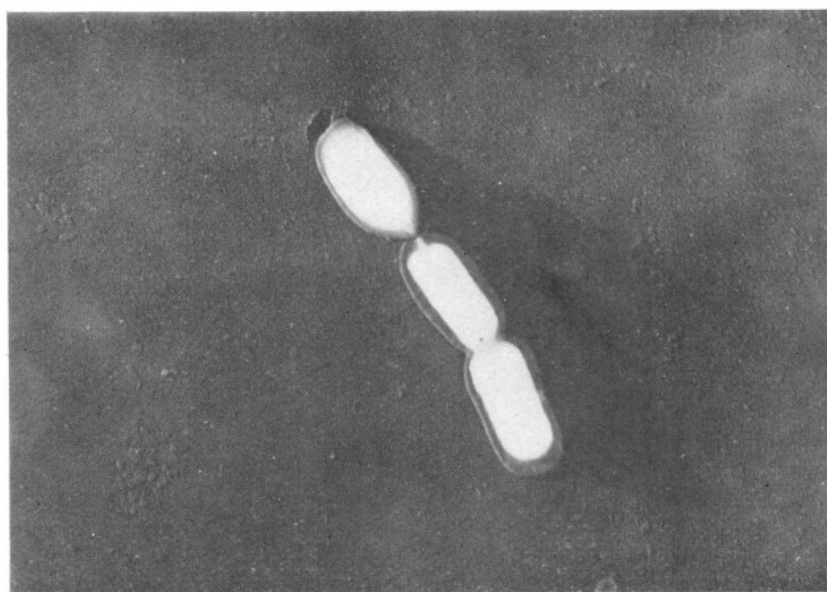
Fot. 16. - *Lactobacillus bifidus* da una brodocoltura di 24 ore (II fase del ciclo di sviluppo): elementi con numerosi processi di divisione in atto, che daranno luogo alla formazione di corpi coccoidi. ($\times 10.000$).



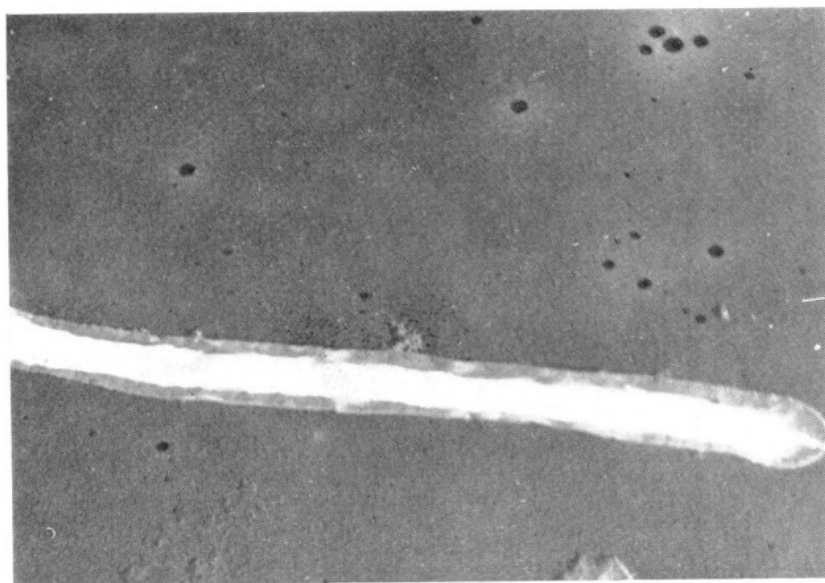
Fot. 17. - *Lactobacillus bifidus* da una brodocoltura di 48 ore (III fase del ciclo di sviluppo): accanto ad elementi adulti di forma bastoncellare, si notano tre elementi coccoidi in via di liberazione dal corpo batterico. ($\times 10.000$).



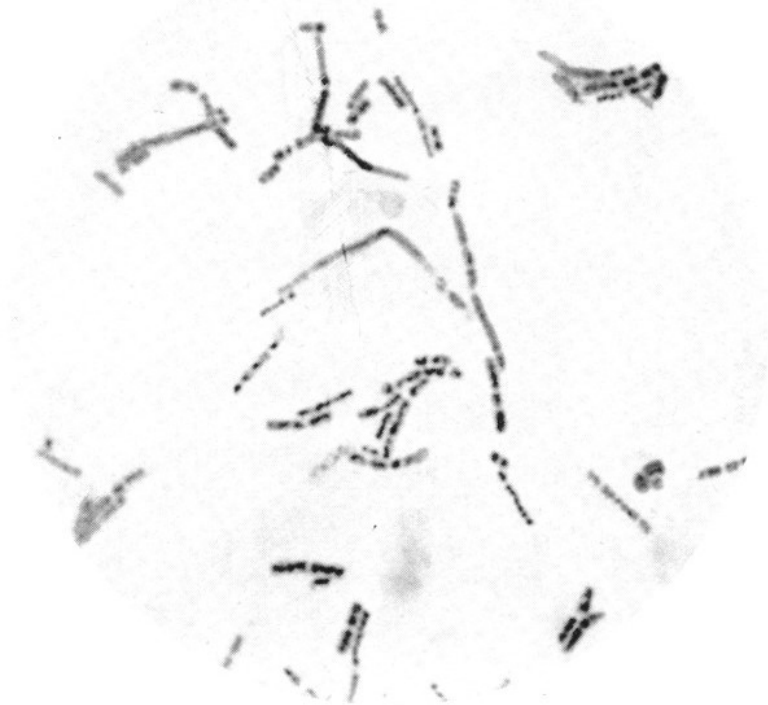
Fot. 18. - *Lactobacillus bifidus*, mutante a resistenza indotta alla penicillina, da una brodocoltura di 12 ore: elemento notevolmente allungato, a citoplasma compatto e membrana cellulare poco evidente. ($\times 10.000$).



Fot. 19. - *Lactobacillus bifidus*, mutante a resistenza indotta alle tetraciclina, da una brodocoltura di 12 ore: elementi a citoplasma compatto ed evidente parete cellulare. ($\times 10.000$).



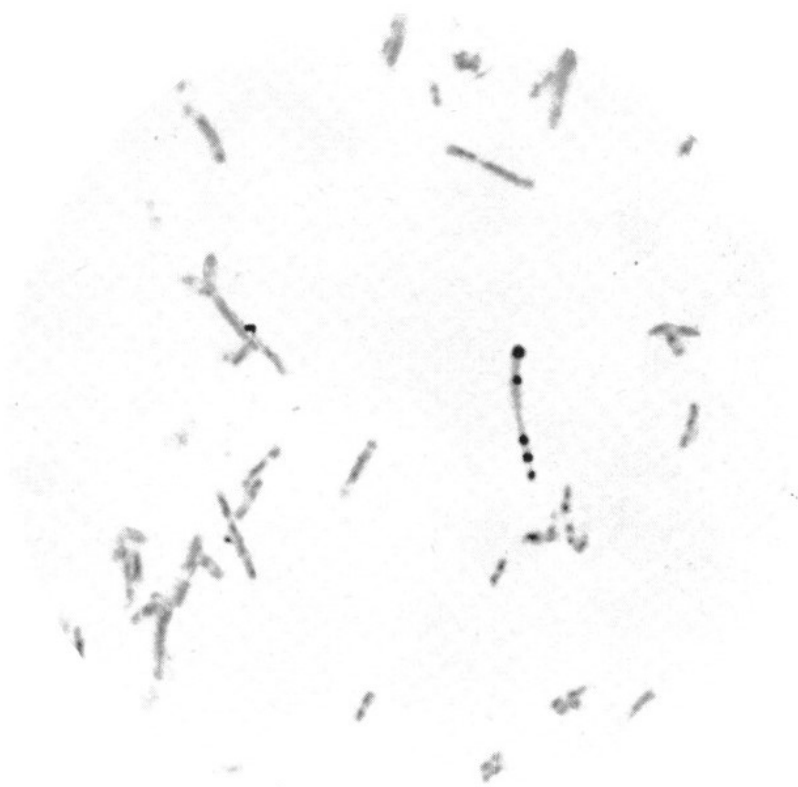
Fot. 20. - *Lactobacillus bifidus*, mutante a resistenza indotta al cloranfenicolo, da una brodocoltura di 12 ore: elemento a citoplasma coartato ed irregolarmente disposto; evidente la parete cellulare. ($\times 10.000$).



Fot. 21. - *Lactobacillus lactis* da una brodocoltura di 24 ore: elementi con granuli interni (colorazione metacromatica di Albert, $\times 1500$).

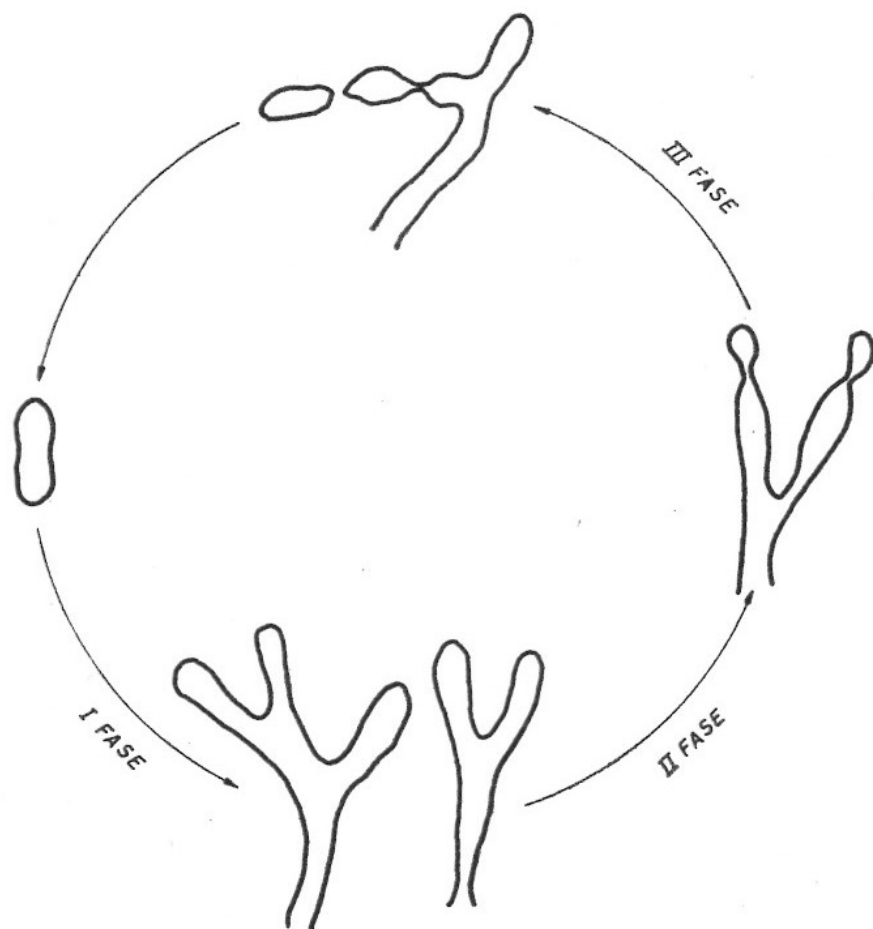


Fot. 22. - *Lactobacillus acidophilus* da una brodocoltura di 24 ore: elementi a citoplasma delicato e numerosi granuli disposti irregolarmente, debordanti dal corpo batterico (colorazione metacromatica di Albert, $\times 1500$).



Fot. 23. - *Lactobacillus bifidus* da una brodocoltura di 6 ore: elemento centrale, a citoplasma delicato e trasparente, con cinque granuli disposti irregolarmente, debordanti dal corpo batterico (colorazione metacromatica di Albert, $\times 1500$).

SCHEMA DEL CICLO DI SVILUPPO DEL
LACTOBACILLUS BIFIDUS



Nella terza fase (Vedi fotografia n. 17) i corpi coccoidi si rendono liberi dando origine, in seguito, a brevi cellule bastoncellari che, con tutta probabilità, daranno inizio al nuovo ciclo vitale.

Queste brevi cellule bastoncellari, procedendo nel loro sviluppo, si allungheranno, assumendo la caratteristica morfologia « bifida ».

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) FLOREY H. W., JENNINGS M. A. - Brit. J. Surgery - Spec. Issue, 112 (1944).
- (²) MILLER C. P., BONHOFF M. - Proc. Soc. Exp. Biol., 60: 354 (1945).
- (³) MILLER C. P., BONHOFF M. - J.A.M.A., 130: 485 (1946).
- (⁴) KLEIN KIMMELMAN L. J. - J. Bact., 52: 471 (1946).
- (⁵) MURRAY R., KILHAN L., WILCOX C., FINLAND N. - Proc. Soc. Biol. Med., 63: 470 (1946).

- (6) MIDDLEBROOK G., YEGIAN D. - Am. Rev. Tuberc., 54: 553 (1946).
 - (7) MILLER C. P., BONHOFF M. - J. Bact., 54: 8 (1947).
 - (8) SCHNEIERSON S. S. - J. Bact., 55: 393 (1948).
 - (9) VON LORCH L. - Rend. Ist. Sup. San., 19: 598 (1956).
 - (10) VON LORCH L. NEGRI R. - Rend. Ist. Sup. San., 18: 36 (1955).
 - (11) DARDANONI L., ZAFFIRO P. - Riv. I.S.I., 30-5: 359 (1955).
 - (12) BOSCO G. - Nuovi Ann. Ig., 6: 123 (1955).
 - (13) MUDD S. - Rend. Ist. Sup. San. Nr. Spec., 67 (1953).
 - (14) BRINGMANN G. - Z. Bact., 107: 40 (1952).
 - (15) BISSET K. A. - Exp. Cell. Research, 3: 684 (1952).
 - (16) GYLLENBERG G. - J. Gen. Micr., 13-2: 394 (1955).
-