



Policlinico



ISTITUTO DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
della R. Scuola Sup. d'Agricoltura in Portici
diretto dal Prof. GIACOMO ROSSI

SUL

BACILLUS OXALATIGENES n. sp.

PER IL

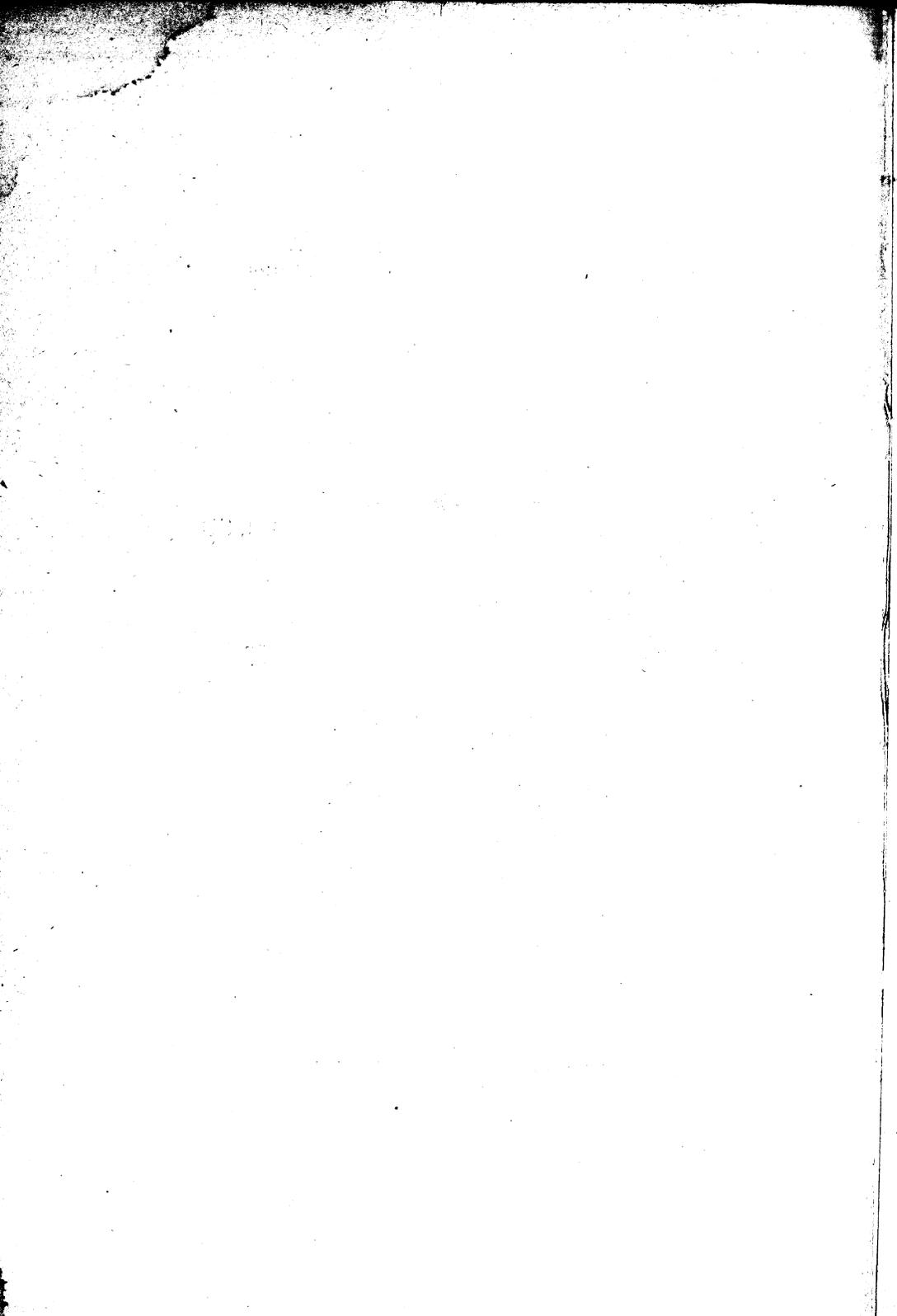
Prof. DOMENICO DE SANDRO

Assistente e libero docente di Patologia Speciale Medica Dimostrativa
e di Clinica Medica nella R. Università di Napoli.



PORTICI
PREMIATO STAB. TIP. E. DELLA TORRE

1913





ISTITUTO DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
della R. Scuola Sup. d'Agricoltura in Portici
diretto dal Prof. GIACOMO ROSSI

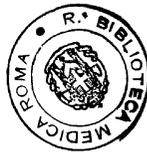
SUL

BACILLUS OXALATIGENES n. sp.

PER IL

Prof. DOMENICO DE SANDRO

Assistente e libero docente di Patologia Speciale Medica Dimostrativa
e di Clinica Medica nella R. Università di Napoli.



PORTICI

PREMIATO STAB. TIP. E. DELLA TORRE

1913

Estratto dagli Annali della R. Scuola Sup d'Agricoltura di Portici, Vol. XI.

Nel riferire i risultati di altre mie ricerche accennai alle principali forme di amilo-batteri che mi fu dato riscontrare nelle feci di uomini normali o affetti da svariate forme morbose.

Fra le varietà più comuni, una è costituita da elementi cellulari delle dimensioni approssimative di emazie umane, di forma quasi sferica, colorantisi con liquido di Lugol in bleu in tutta la loro estensione, talora isolati, più spesso riuniti in gruppi di 5-10-20, liberi o inclusi in detriti alimentari, ciò che potrebbe denotare la loro importanza nella digestione o fermentazione di alcuni alimenti. Talora essi sono così abbondanti che, trattando un frammento di feci con Lugol, già macroscopicamente si rende visibile una colorazione violacea del preparato.

Per forma, dimensioni e raggruppamento tali amilobatteri, mai segnalati neppure nelle fermentazioni pectiche, a prima vista potrebbero mascherare dei blastomiceti; ma non sono tali e lo dimostra, fra gli altri fatti, la mancanza di gemme.

Un po' meno frequente ho riscontrato nelle feci umane una altra varietà a caratteri morfologici molto somiglianti alla precedente, solo che gli elementi presentansi leggermente ovali e per lo più mostrano a un estremo un punto incolore (spora).

In una terza varietà ho riscontrato forme somiglianti molto a diplococchi: sono piccoli elementi a punto, accoppiati, per lo più forniti di capsula.

Si possono vedere delle forme molto somiglianti alle precedenti, con elementi più grossi e nei quali vi è lieve predominio di uno degli assi come nelle forme diplococco-batteriche

Altre varietà sono costituite da bastoncini sottili ed allungati, a estremità nette. Sono colorabili in bleu con Lugol in tutta la loro estensione e allora possono accoppiarsi o formare lunghi filamenti, che talora sono abbondantissimi e si intrecciano in vario modo. Altre volte si colorano solo in parte e si possono avere varie evenienze: può colorarsi in bleu un solo estremo del bacillo, o ambo gli estremi mentre la parte centrale rimane incolore o viceversa si colora solo la porzione centrale, o si colorano soltanto i $\frac{2}{5}$, i $\frac{3}{5}$ ecc. del corpo batterico, oppure a un punto colorato tien dietro un punto incolore e così via, in modo che nell'insieme ne risulta una forma punteggiata, seghettata.

Meno frequente accade di rinvenire nelle feci umane forme molto comuni nella decomposizione subacquea di frammenti di vegetali, cioè bastoncini in tutto colorabili con Lugol e forniti di una spora terminale che rimane incolore.

Una di queste ultime forme ho avuto la fortuna di isolare dalle feci di una isterica: essa sostituisce l'obbiettivo di questa breve nota: su alcune sue proprietà ho già brevemente comunicato alla Società Chimica Italiana, Sezione di Napoli, nella seduta del 26 giugno 1912 (V. Rendiconto, Fasc. IX, agosto 1912).

Trattasi di un batterio non ancora da alcuno conosciuto, fornito di proprietà morfologiche e biologiche di grandissimo interesse. È aerobio; è amilo-batterio soltanto in un breve periodo della sua evoluzione e in determinate condizioni di cultura.

Ecco, brevemente, in qual modo sono pervenuto a questo isolamento.

Un frammento centrale di scibile fecali di un'isterica, raccolte quanto più sterilmente possibile in scatola di Petri sterile, è stato stemperato in un matraccetto contenente acqua distillata sterile: del liquido ottenuto, nel quale i batteri trovavansi più o meno uniformemente sospesi e a grande diluizione, si sono versate 5 gocce in ognuno di 60 tubi contenenti patata alla Rossi, cioè pezzetti di patata cruda in acqua sterile.

La preparazione di tali tubi è cosa molto delicata per la facilità d'inquinamenti. Occorre servirsi di patate molto grosse, lungamente lavate sotto un getto di acqua corrente. Su un becco Bunsen si riscalda fortemente la parte periferica della patata che si porta rapidamente su una lastra metallica precedentemente arroventata e tuttora caldissima. Al disopra della lastra si tiene

sospesa una campana di vetro. Lavorando con l'aiuto di uno, e possibilmente di due assistenti, si taglia sotto la campana, con coltello passato sulla fiamma, la parte periferica della patata, tenuta ferma con un robusto ago precedentemente arroventato; la porzione della patata si taglia in pezzettini, ciascuno dei quali si ripone in un tubo da saggio contenente 2-3 c. c. di acqua sterilizzata all'autoclave. I tubi con tappo di ovatta, si sterilizzano, al solito nella stufa a secco: poi si versa l'acqua e si sterilizza all'autoclave. L'estremo superiore del tubo si passa sulla fiamma, prima d'introdurvi il frammento di patate.

Con tale tecnica si dovrebbero ottenere tutti i tubi sterili: però, anche usando le massime precauzioni, è possibile che qualche tubo s'inquinì. È perciò indispensabile che i tubi, prima di servirsene per le culture, vengano lasciati durante alquanti giorni a termostato: indi si procederà allo scarto dei tubi inquinati.

In tal modo si ottengono sterili in acqua frammenti di patata cruda: terreno questo, come mise in evidenza Rossi, che lo propose, molto adatto per lo studio dei fermenti pectici dei vegetali.

Ritornando all'esposizione delle mie esperienze, il grado di diluzione della particella fecale era stato tale che si poteva desumere di avere seminato in ogni tubo o nessun batterio, o una o poco più di una cellula batterica. E infatti lasciati i tubi a termostato a 37.° qualcuno di essi rimase sterile, negli altri si svilupparono culture più o meno pure.

In due soli dei 60 tubi, verso il 4-5 giorno l'esame microscopico rivelò la presenza di alquanti amilobatteri analoghi a quelli che avevo rivelati, in discreta quantità, all'esame diretto delle feci in parola, cioè bastoncini lunghi, quasi interamente colorabili con Lugol e forniti di una spora terminale incolorabile. Dopo altri 2-4 giorni gli amilo-batteri scomparvero: persistevano forme bacillari non colorabili con Lugol.

Verso il 15° giorno dall'inizio dell'esperienza la patata subì la fermentazione pectica, rammollendosi prima e trasformandosi dopo in una specie di poltiglia biancastra, che al microscopio fece notare moltissimi granuli caratteristici di amido, betteri non colorabili in bleu con Lugol, rarissimi cristalli di ossalato di calcio, ai quali non credetti di assegnare importanza, ché anzi non richiamarono gran che la mia attenzione e credetti provenissero delle faci innestate, benché in forte diluzione, o da circostanze fortuite.

Mi proposi di rendere pure le culture con dei passaggi successivi in patata alla Rossi, dopo averle riscaldate per 10 minuti a bagno maria a 80° C. per distruggere i batteri non sporigeni eventualmente presenti.

Dopo un numero vario di tali passaggi, mi accorsi che continuavano a svilupparsi scarsi amilobatteri, i quali scomparivano in pochi giorni, che insieme nei tubi compariva una gran quantità di piccolissime cellule, corte, leggermente ovali, con parte centrale molto rifrangente (su di esse ritornerò quanto prima); che la presenza dei cristalli di ossolato di calcio era un fatto costante. Però nei successivi passaggi la fermentazione pectica andava attenuandosi e persino scomparendo.

Arrivati a questo punto, volli vedere che cosa avvenisse facendo dei passaggi in tubi di patata alla Rossi, lasciati, prima dell'innesto, 12 minuti a bagno maria a 100° C. Ebbe luogo un fatto che mi sorprese: al 3°-5° giorno, dacehè tali tubi stavano a termostato, pur rimanendo il liquido limpido e la patata integra, sul fondo si raccoglieva come una nubecola, che al microscopio risultava costituita da scarso detrito amorfo proveniente dalla patata e da miriadi di bellissimi amilobatteri (senza altre forme microbiche) riuniti in ammassi ricchissimi, come intricati gomitoli.

Uno sviluppo così rigoglioso di amilo-batteri non si era mai da alcuno ottenuto, tanto che l'osservazione dei preparati meravigliò molto il Prof. Rossi. La meraviglia era tanto maggiore in quanto la cultura aveva tutti i caratteri di una completa purezza e si era aerobicamente sviluppata, mentre tutti gli amilo-batteri sinora studiati dagli altri autori si erano mostrati strettamente anaerobici.

Gli amilo-batteri così ottenuti si presentarono sotto forma di bastoncini con lunghezza di μ 5,5-7,7 con spessore di μ 1,5, colorabili con Lugol in tutta la loro estensione meno per una spora-terminale e per un piccolissimo tratto, che, sotto forma di lineetta, in molti elementi rimane incolore e che trovasi verso l'estremo opposto a quello in cui risiede la spora, rimanendo tuttavia lontano dalla estremità per $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{4}$ dell'intera lunghezza del bacillo. Tali batteri si colorano in un bel viola con Lugol anche nei preparati disseccati e fissati col calore, assumono bene i colori basici di anilina, meno per la spora che non si colora; si colorano molto bene con l'eosina; non sono acido-resistenti.

Trapiantando da quei tubi il batterio in altri tubi alla Rossi scaldati a bagno maria, lo sviluppo degli amilo-batteri era di

nuovo rigogliosissimo, ciò che non aveva luogo per trapianti in tubi di patata non scaldati.

Nei cennati tubi alla Rossi riscaldati, mentre si otteneva tale rigogliosissimo sviluppo di amilo-batteri, non si aveva fermentazione pectica della patata e la produzione di ossalato di calcio era scarsissima, o assente; di più quelle piccole forme batteriche ovali, alle quali si è accennato e sulle quali si ritornerà quanto prima, non apparivano.

Arrivati a questo punto una domanda era naturale: le culture erano esse pure? Era piuttosto da pensare che si trattasse di culture impure e da qui lo sviluppo aerobico di un amilo-batterio anaerobico, reso possibile da simbiosi? Altre ipotesi non potevano presentarsi; non poteva pensarsi che lo sviluppo aerobico di un anaerobio fosse reso possibile dallo speciale terreno nutritivo costituito da un frammento di vegetale crudo (Ori), perchè lo sviluppo si aveva anche nella patata scaldata.

Ecco la necessità di piastre di isolamento su agar. Tali piastre ho allestite da vari tubi aerobicamente: ho costantemente ottenuto piccole colonie circolari, come teste di spillo, un po' rilevate sulla superficie, bianco-lattiginose, un po' lucenti. Tali colonie trapiantate in tubi di agar a becco hanno costantemente dato luogo a culture pure, sempre identiche fra di loro e identiche altresì alle culture che ottenevo strisciando direttamente sulla superficie dell'agar un'ansa di materiale prelevato dai tubi di patata. Cioè dopo poche ore di termostato appare sulla superficie dell'agar una sottile patina quasi trasparente, gelatinosa, costituita da bastoncini corti, sottili, non colorabili in bleu con Lugol, mobilissimi: in alcuni di essi vi è un punticino centrale più rifrangente, che, al contrario del resto del corpo batterico, non assume i colori di anilina. In questi ultimi la mobilità va progressivamente spegnendosi. Continuando a tenere i tubi in termostato, la patina batterica diviene più rilevata, più spessa, più abbondante, va assumendo colore ed aspetto bianco lattiginoso, lucente. Di pari passo in tutti o quasi i bastoncini va apparendo il punticino centrale molto rifrangente ed esso stesso, aumentando di volume a spese del corpo batterico, diviene nettamente ovale, invade quasi tutta la massa batterica (Fig. 3.).

In questo momento dopo 24-48 di termostato, il bacillo, sempre piccolo, misura al massimo μ 2,4 di lunghezza per 1,5 di spessore, è immobile. La parte centrale non può essere che una spora, difatti

il batterio rimane vitale dopo uno scaldamento per oltre 15 minuti a 80° C. e non si colora con violetto di genziana acquosa né con bleu di metilene. Tali colori sono assunti soltanto della periferia del batterio. Con liquido di Ziehl a caldo la parte periferica si colora intensamente e la centrale debolmente; se successivamente si tratta con acido acetico al 5%, il colore persiste; con acido solforico diluito tutto il batterio si decolora. Con liquido di Giemsa il batterio si colora nella sua totalità, la parte centrale però meno debolmente.

Il batterio si presenta vitale per diversi mesi in agar, nè sinora ho osservato fenomeni di degenerazione nei passaggi successivi.

Se dall'agar il batterio si trasporta in brodo alcalino avviene quanto segue: lo sviluppo non è mai molto rigoglioso, il brodo diviene molto leggermente opalino, sul fondo si raccoglie scarso deposito pulverulento costituito da bastoncini sottili, lunghi μ 4-5, senza spora terminale, non colorabili in bleu con Lugol, assumenti gli ordinari colori di anilina. Quale strano polimorfismo! Quali differenze fra le culture in agar e in brodo! Parrebbe trattarsi di due differenti batteri. Ma se dal brodo si passa in agar, riappaiono le forme caratteristiche con spora centrale, e così via.

Con l'invecchiare delle culture sulla superficie del brodo si forma una pellicola costituita da spore centrali ovali analoghe a quelle che si hanno in agar.

In tubi di cetriolo all'autoclave il batterio cresce molto rigogliosamente e con gli stessissimi caratteri che in agar, non dà mai forme colorabili in bleu viola con Lugol, non vi produce acido ossalico.

Su tubi di patata alla Rossi si ha scarsissimo viluppo di bastoncini, sottili, senza spora terminale e non colorabili in bleu con Lugol; quando queste culture invecchiano, appaiono delle forme somiglianti a quelle che si hanno su agar.

Il batterio da agar innestato in patata alla Rossi, nei primi tempi, quando non ancora aveva subito molti passaggi, dopo il terzo o quarto giorno dava forme a bastoncini, colorabili in bleu con Lugol, forniti di spora terminale, in seguito apparivano moltissime forme identiche a quelle che si hanno da agar, la patata subiva la decomposizione e si aveva formazione di molti cristalli di ossalato di calcio.

Attualmente nelle culture in agar, per i molti passaggi subiti, il batterio innestato in patata alla Rossi difficilmente dà forme

colorabili con Lugol, meno raramente, e dopo parecchi giorni dall'innesto dà le forme caratteristiche da agar; non è più capace di decomporre la patata e produrre cristalli di ossalato di calcio. Lo stesso avviene nei tubi contenenti patata alla Rossi scaldati per 12 minuti a bagno maria a 100° C.

Ma, fortunatamente, le culture su agar riproducono tuttora, dopo i moltissimi passaggi avvenuti, l'insieme delle proprietà del batterio allorchè s'innestano su speciale terreno, costituito da patata in acqua, sterilizzata all'autoclave. Ecco quanto si verifica in tali tubi.

Già sin dalle prime ore di termostato sulla superficie del liquido si va formando una schiuma bianca, che persiste durante i primi giorni; osservando attentamente il tubo si vedono numerose piccolissime bollicine gassose sollevarsi dal fondo.

Il liquido in 1-2 giorni diviene gialletto, leggermente opalino, mai molto torbido, non emana odore disgustoso.

Dopo 24 ore di termostato si vedono moltissime forme batteriche identiche a quelle che si hanno su agar e inoltre molti bastoncini lunghi, non colorabili in bleu con Lugol, alcuni forniti di spora terminale

Dopo 48-56 ore di termostato appaiono i caratteristici amilo batteri con le spore terminali, di forme e di dimensioni eguali agli amilo-batteri che ottenevo in ammassi nei primi tubi alla Rossi scaldati a bagnomaria, con questa sola differenza che il corpo batterico, per il iodo, si colora in bleu pallido anzicchè in viola, e che non sono mai così abbondanti da dare delle masse intrecciate

Dopo 3-5 giorni di termostato gli amilo-batteri vanno diminuendo di numero sino a scomparire, anche le forme a bastoncini lunghi, non sporificati e non colorabili con Lugol, diminuiscono e invece crescono smisuratamente le forme che si sogliono avere nelle culture in agar. Anzi queste ultime forme sogliono essere quasi l'unico costituente di una pellicola pulvirulenta che si va formando sulla superficie del liquido

Dopo 10-15 giorni di termostato appaiono nel liquido cristalli di ossalato di calcio, che sono più abbondanti se la patata si è rammollita e sgretolata: quando poi la patata rimane dura, come quasi sempre accade, un frammento di essa, staccato con l'ansa ed osservato al microscopio, presenta una grande quantità di cristalli di ossalato di calcio, che talora sembra sieno inclusi nelle cellule di patate.



Il bacillo che ho isolato, produce indubbiamente acido ossalico. Questa sua proprietà è più importante delle altre, consistenti nell'essere spiccatamente polimorfo, nel comportarsi da amilo-batteri in opportune condizioni e da amilo-batterio aerobico. È perciò che propongo si chiami *bacillus oxalatigenes*, da non confondersi col *bacillus oxalaticus* di Zopf, col quale non ha nulla di comune.

L'acido ossalico deve con probabilità provenire dall'ossidazione dell'amido della patata; esso, combinandosi col calcio dell'acqua potabile adoperata nella preparazione dei tubi di patata e col calcio contenuto nella patata stessa (1, 7% di ossido di calcio nelle ceneri le quali rappresentano il 10% della patata fresca secondo Wemer), dà i caratteristici cristalli.

La produzione di acido ossalico è talora così grande che non sempre le tracce di calcio contenute nell'acqua e nella patata sono sufficienti a saturarle; ed infatti, se prima dell'innesto dei batteri si aggiunge in maniera sterile, Ca CO_3 nei tubi, il numero dei cristalli di ossalato che si forma è più rilevante.

I cristalli si presentano più comunemente ottaedrici quadrati, somiglianti a buste di lettere, a dimensioni variabili dai più piccoli, quali granuli, a più grandi, così voluminosi come difficilmente accade di riscontrare nei sedimenti degli ossalurici. Più raramente si rinvengono cristalli pure ottaedrici, ma rettangolari, romboidali, a doppia piramide, anzicchè quadrati.

Frequenti possono essere pure le forme a bacchettine di vetro isolate e talora incrociate, meno frequenti sono i cristalli ovoidali e quelli cosiddetti a orologi a polvere o a bisaccia, i quali possono accoppiarsi a due a due incrociandosi, oppure a più di due, dando delle rosette.

Che si tratti di ossalato di calcio si deduce, oltre che dalle forme cristalline caratteristiche, dalle reazioni microchimiche: insolubilità nell'acido acetico, solubilità nell'acido cloridrico.

L'obbiezione che l'ossalato di calcio riscontrato nelle culture provenga esclusivamente dall'acido ossalico naturalmente contenuto nella patata non regge.

Secondo Esbac, cui siamo debitori di un'accurata tavola sulla percentuale di acido ossalico nei principali alimenti, le patate non contengono che gr. 0,05 di quell'acido per ogni Kg. Secondo Siewert nelle patate gli ossalati sono contenuti nella proporzione di 0,017 %.

Nel pezzetto di patata dei tubi di cultura non possono quindi contenersi che frazioni infinitesimali di milligrammo di acido ossalico. Viceversa la quantità di ossalato di calcio è accentuata e talora notevolissima: conservo un tubo in cui la patata è ridotta in una massa pulverulenta, che al microscopio presenta miriadi di cristalli di ossalato di calcio e che con Lugol non si colora in bleu, come se tutto l'amido sia stato ossidato.

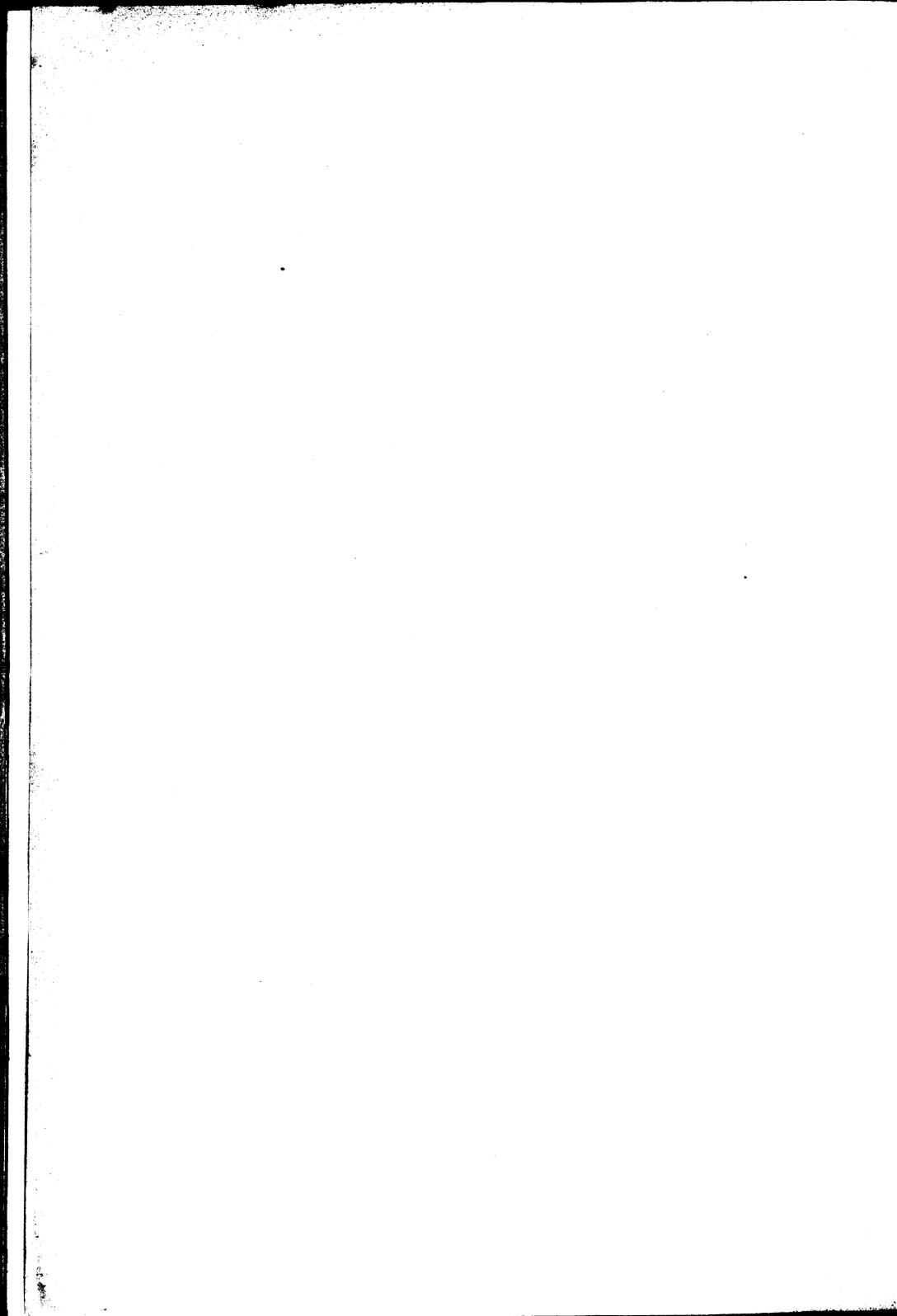
Ma vi sono ancora altri argomenti.

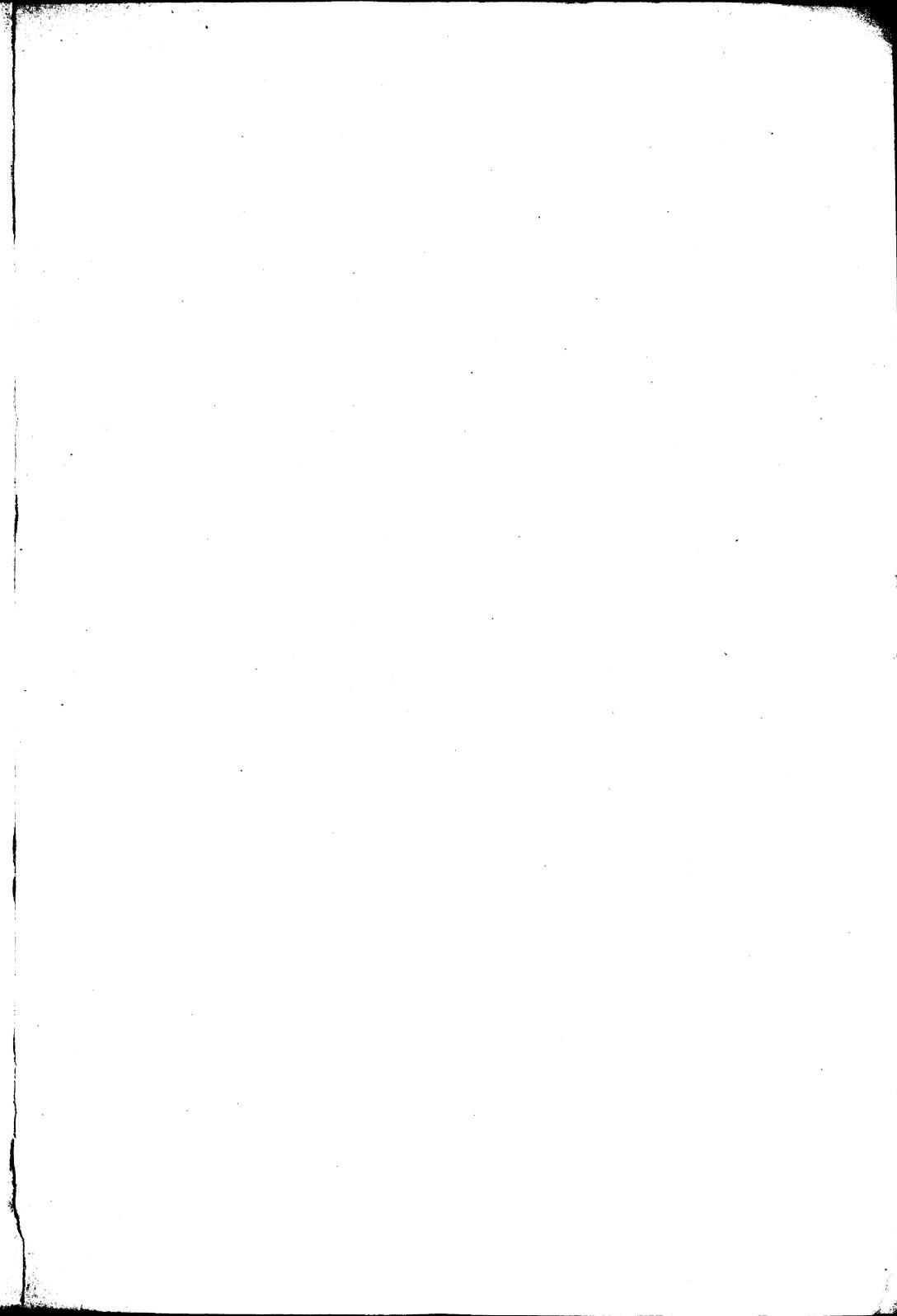
Nei tubi di patata in cui si innestano altri batteri pectici o non, non si rinvengono cristalli di ossalato di calcio. Rossi, che molto attentamente ha studiato chimicamente e microscopicamente ciò che si ottiene dalla decomposizione spontanea delle patate sott'acqua, non ha mai riscontrato cristalli di ossalato di calcio. Anche io ho esaminato molto attentamente e accuratamente il residuo della decomposizione subaquea, spontanea di pezzi di patata. Mai vi ho riscontrato cristalli di ossalato di calcio. Oltre a ciò nei tubi di cetriolo non si ha produzione di ossalato di calcio. E pure il cetriolo contiene, secondo Cipollina gr. 0,25 di ac. ossalico per ogni Kgr., cioè una quantità quintupla che la patata.

Può il batterio da me isolato, influire nella genesi dell'ossaluria umana? Non è improbabile, ma di ciò più di proposito mi occuperò in seguito. Per ora mi duole di non poter dire, avendo perdute le tracce della paziente, se l'isterica, dalle cui feci il batterio ho isolato, fosse o pur no ossalurica.

Il *bacillus oxalutigenes*, che ho isolato e descritto, non ha proprietà patogene, almeno nei cani, conigli e cavie su cui ho sperimentato meno per ciò che si riferisce alla produzione di ossalato di calcio di cui dirò in altro lavoro. Perfettamente innocue si sono dimostrate le iniezioni sottocutanee, intraperitoneali, endovenose di gran quantità di cultura in agar stemperata in soluzione fisiologica; del pari innocua si è dimostrata la introduzione delle culture *per os* e il suo deposito entro tasche sottocutanee dell'addome. Nè mi è riuscito renderlo virulento coltivandolo in speciali terreni (agar glicerinato, agar con sangue).

Negli animali, in vario modo inoculati col batterio, non si sono prodotti corpi immuni (siero-agglutinazione e deviazione del complemento negative, assenza di precipitine ecc.).





Stampe



MINISTERO DI BATTERIOLOGIA AGRARIA

DELLA

R. Scuola Superiore di Agricoltura
in PONTICI

Laboratorio e Gabinetto di Batteriologia

Stazione di Microbiologia Industriale

Stazione agricolo-antitipografica

1907

M^{ro} Figueras

Prof. Comm. Servizio Postale

Via del Tribunale 46

Roma