

Moin B79/49.

48
49

AMILCARE ZIRONI - ERMINIO CARLINFANTI



Il complesso biostatico

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA" - VOL. II, 1943-XXI

Esemplare fuori commercio per
la distribuzione agli effetti di

AMILCARE ZIRONI - ERMINIO CARLINFANTI

Il complesso biostatico

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. II, 1943-XXI

AMILCARE ZIRONI E ERMINIO CARLINFANTI

IL COMPLESSO BIOSTATICO

LO studio delle leggi che regolano la formazione e la vita delle popolazioni microbiche nelle culture è, nonostante l'estensione e la profondità delle ricerche batteriologiche, relativamente negletto. L'argomento, malgrado la semplicità di costituzione di alcuni terreni nutritivi e la costanza raggiungibile per alcune condizioni (temperatura, umidità, illuminazione) è assai complesso, perchè la proliferazione microbica crea fra i germi in una colonia o in uno stesso terreno liquido rapporti di concorrenza vitale, e modifica ad ogni istante la composizione del terreno, facendovi variare la tensione dell'ossigeno, la concentrazione dei principi alimentari, il pH, e versandovi una quantità di sostanze, sulle quali nulla si sa di positivo, capaci di stimolare o di inibire lo sviluppo.

Non è escluso nemmeno che, oltre a fattori chimici, anche energie fisiche elaborate dagli stessi germi, esplicino un'azione sullo sviluppo ulteriore della popolazione microbica, eccitandolo o inibendolo.

In una serie di pubblicazioni abbiamo affrontato un complesso di problemi di ecologia microbica, esaminando in particolar modo i quesiti relativi a quell'insieme di fattori inibenti lo sviluppo che abbiamo denominato « complesso biostatico ».

In questa Nota riassumeremo le ricerche che ci hanno indotto a formulare tale concetto ed a precisarne il significato biologico. All'esposizione delle nostre ricerche crediamo utile far precedere

qualche accenno sui risultati degli studi finora effettuati sulle modalità di sviluppo dei germi in terreni liquidi.

La terminologia proposta da Lane-Claypon si è affermata ed è oggi universalmente accettata. Le successive ricerche di Buchanan hanno precisato e suddiviso le diverse fasi dello sviluppo che vengono designate come segue:

I. *Fase stazionaria iniziale*, durante la quale il numero dei germi rimane costante.

II. *Fase di latenza* o fase di accelerazione positiva dello sviluppo.

III. *Fase logaritmica dello sviluppo*, durante la quale la velocità di moltiplicazione rimane costante.

IV. *Fase di accelerazione negativa dello sviluppo*.

V. *Fase stazionaria massimale*.

VI. *Fase di accelerazione positiva della mortalità*.

VII. *Fase logaritmica della mortalità*, durante la quale il coefficiente di mortalità rimane costante.

Le fasi dello sviluppo microbico in culture liquide, che hanno maggiormente richiamato l'attenzione degli studiosi, sono la fase di latenza e la fase di accelerazione negativa dello sviluppo; sono queste, infatti, che racchiudono in sé l'origine dei fattori determinanti lo sviluppo dei germi in cultura e l'arresto dello sviluppo stesso. Le teorie avanzate per l'interpretazione della fase di latenza sono numerose. Buchanan e Fulmer ne enunciano otto e ne aggiungono una propria. Quelle più degne di menzione attribuiscono la mancanza di sviluppo alla necessità di adattamento alle nuove condizioni (Fulmer) o di secrezione nel terreno nutritivo di sostanze indispensabili allo sviluppo; altri ritengono che la incapacità di moltiplicazione sia espressione delle lesioni riportate dai germi nella cultura di partenza per opera dei prodotti del proprio metabolismo (Chesney). Buchanan e Fulmer, infine, ritengono che si tratti piuttosto di un « periodo di riposo » paragonabile a quello degli organismi vegetali (semi, bulbi, tuberi). È interessante notare che la entità della semina esercita un'influenza sulla durata della fase di latenza, che è più lunga quando il trapianto viene eseguito con piccole quantità di cultura (Rahn). Pearl ravvicina questo

fenomeno a quello analogo che si osserva nello sviluppo delle popolazioni di insetti, che si moltiplicano in un ambiente limitato (popolazioni chiuse).

Il problema dell'arresto dello sviluppo dei germi in cultura è stato oggetto di molte ipotesi. Le più importanti di esse – secondo Henrici – possono essere così riassunte: lo sviluppo cessa perchè le sostanze nutritive sono esaurite e gli organismi sono affamati; oppure perchè alcuni prodotti secondari allo sviluppo o materiali di escrezione o « autotossine » specifiche offendono i germi; oppure perchè l'« affollamento » in senso puramente meccanico ne limita la proliferazione.

La prima di queste nostre memorie si riferiva ai fattori che regolano lo sviluppo delle leptospire in cultura.

In realtà l'aver scelto questa specie di germi come oggetto delle nostre prime ricerche, se da un lato ha difficoltàato la loro esecuzione tecnica a causa della particolare fragilità delle leptospire, che si manifesta con una tendenza alla rapida lisi non appena le condizioni dell'ambiente si allontanano dall'*optimum*, d'altra parte ci ha fornito un modello sperimentale adatto ad alcune indagini non prive di importanza teorica.

La tendenza delle leptospire alla lisi è un fenomeno fondamentale per l'interpretazione del comportamento di questi germi di fronte a diverse condizioni. Cominciammo perciò da esso le nostre ricerche, ritenendo che l'analisi di questo fenomeno sotto i suoi vari aspetti servisse come opportuna introduzione allo studio delle proprietà biologiche delle leptospire.

Le ricerche sul comportamento delle leptospire di fronte all'azione di sostanze chimiche o di energie fisiche dimostrarono la loro estrema tendenza alla lisi; le agglutinine specifiche (legate nei sieri esaminati alla frazione pseudoglobulinica e non come di consueto alla euglobulinica) dissolvono le leptospire anche in assenza di complemento. Questa proprietà litica si manifesta soltanto in presenza di elettroliti ed è in rapporto con la lability delle leptospire che l'anticorpo rende maggiormente sensibili all'azione litica dei sali. Lo spunto alle ricerche sulle condizioni capaci di influenzare lo sviluppo delle leptospire *in vitro* ci venne da osservazioni sulla filtrabilità di questi germi attraverso candele.

È noto che anche dei batteri « non filtrabili » attraverso le candele porose, le possono attraversare quando si trovano immerse in un liquido culturale. Questo fenomeno viene indicato con il nome di « migrazione » per candela. Le sistematiche esperienze di Petraghani sulla migrazione microbica per candela hanno portato ad una distinzione dei germi più comuni in « virus migranti » e « virus non migranti » che è indubbiamente del più alto interesse per lo studio dei microorganismi.

Le nostre esperienze dimostrarono che le leptospire sono capaci costantemente di migrare attraverso le candele immerse nelle culture, ma non riescono a moltiplicarsi rigogliosamente nel liquido nel quale sono passate attraverso il filtro. Ci domandammo allora se la incapacità della proliferazione delle leptospire migrate non potesse essere in rapporto semplicemente con il loro scarso numero. Abbiamo perciò intrapreso delle ricerche allo scopo di determinare quale quantità di cultura sia necessario seminare per ottenere uno sviluppo apprezzabile di leptospire. Seminando piccole quantità di culture le leptospire seminate divengono rapidamente meno rifrangenti e dopo qualche giorno scompaiono completamente. Se la semina è un po' più abbondante si può avere un certo sviluppo durante i primi giorni, ma ben presto, prima che lo sviluppo sia completo, la vitalità delle leptospire diminuisce e interviene la loro degenerazione e lisi.

Soltanto se la quantità di cultura seminata è superiore ad un certo limite, lo sviluppo avviene in modo ottimale. Questa quantità minima necessaria per dar luogo a culture rigogliose varia col variare della vitalità dello stipo usato per l'esperienza, della densità della cultura di partenza e soprattutto della quantità del terreno. Tuttavia a parità di condizioni tale quantità minima capace di dar luogo a sviluppo non è funzione lineare del volume del liquido nel quale si trovano le leptospire subito dopo il trapianto. Il rapporto fra questa quantità minima trapiantabile e la quantità di terreno nel quale si effettua la semina diviene più piccolo, se si aumenta la quantità del terreno in cui si trapiantano le leptospire. La fase stazionaria iniziale e la fase di latenza si osservano anche nelle culture di leptospire. È anzi nozione già acquisita (vedi Reitano) che si può avere la scomparsa di leptospire nel terreno

durante i giorni seguenti alla semina, e soltanto dopo qualche giorno la ricomparsa di esse e il loro rigoglioso sviluppo. Occorre però precisare che questa scomparsa si ha solo in casi eccezionali, tanto più rari se per il trapianto ci si serve di culture non invecchiate. A questo proposito osserviamo che il rapporto fra fase di latenza e età della cultura di partenza è molto importante e costituisce un dato non trascurabile per l'interpretazione della latenza stessa. Ciò appare evidente se si rappresenta su un sistema di coordinate la velocità di sviluppo delle leptospire durante successivi trapianti effettuati dopo la fase logaritmica dello sviluppo. La curva che ne risulta assume, evidentemente, un andamento periodico, e la fase di latenza appare in queste condizioni come la continuazione di un fenomeno già preesistente nella cultura di partenza e che non si arresta istantaneamente nel nuovo terreno, perchè le cellule risentono ancora l'effetto dei fattori che hanno rallentato la moltiplicazione nelle culture di partenza.

Questa spiegazione non serve però a darci ragione della latenza quando si adoperino per il trapianto culture in fase di accrescimento logaritmico.

Nel caso delle leptospire, poi, la fase iniziale assume un carattere particolare in quanto, se la semina non è sufficientemente abbondante, non solo si ha la latenza, ma anche la mancanza assoluta di sviluppo per la incapacità di moltiplicazione e la degenerazione delle leptospire. Nella rappresentazione grafica delle variazioni della velocità di sviluppo prima e dopo il trapianto, questa sterilità delle leptospire appare come una discordanza fra il computo teorico, che prevede un'ascesa della curva dopo le fasi iniziali, e la curva reale che in seguito al trapianto si porta rapidamente fino allo zero.

Così rappresentato questo contrasto richiama alla mente il fenomeno studiato dal matematico italiano Volterra e da Lotka a proposito delle fluttuazioni del numero degli individui di due specie biologiche, una delle quali si nutre a spese dell'altra, fenomeno in seguito osservato in tutte le moderne ricerche matematiche di cinetica biologica sui parassiti. Anche in questi casi si trova, infatti, che mentre l'analisi matematica prevede diminuzioni e aumenti alternati del numero dei parassiti obbligati senza che

questo tocchi mai lo zero (cicli periodici di Volterra e Delevsky), i dati empirici indicano, al contrario, che, se il numero di questi esseri diviene troppo piccolo, non riesce più a risalire e si ha la scomparsa almeno temporanea della specie.

L'analogia fra questi fenomeni appare manifesta, anche se l'interpretazione di essi è diversa.

È evidente nel caso delle leptospire l'intervento di fattori indipendenti dall'adattamento degli elementi trapiantati o dal loro risveglio da uno « stato di riposo ». *A priori* ci apparve probabile che le leptospire potessero svilupparsi in un terreno nutritivo soltanto se in esso venissero anche ed in sufficiente quantità immesse delle sostanze elaborate dalle stesse leptospire atte a stimolarne lo sviluppo, condizione analoga a quella occorrente per ottenere lo sviluppo, ad esempio, del bacillo dell'enterite ipertrofica dei bovini. In favore di tale idea depone il risultato delle esperienze surriferite sulla quantità di cultura necessaria per ottenere lo sviluppo di leptospire in diversi volumi dello stesso liquido nutritivo. L'ipotesi di una diluizione di un fattore stimolante contenuto nelle culture di partenza può spiegare come per ottenere la proliferazione progressiva di leptospire in 100 cmc. di terreno nutritivo, sia necessario insemenzare una quantità maggiore di cultura che non in 10 cmc., restando pari tutte le altre condizioni (natura del terreno, rapporto fra superficie e volume del terreno stesso, ceppo di leptospire usato).

I risultati ottenuti dimostrano l'esistenza nelle culture di un principio capace di favorire lo sviluppo delle leptospire determinandone la rapida moltiplicazione in seguito al trapianto.

Del resto la dimostrazione nelle culture microbiche di principi atti a favorire lo sviluppo dei germi stessi non è nuova. Un « principio accelerante » messo in libertà dalle cellule batteriche è stato descritto da Rondoni nelle culture di bacillo tubercolare. Era già noto che il bacillo di Johnne non si sviluppa rigogliosamente in cultura se questa non contiene bacilli acidoresistenti morti od estratti di essi (Stuurmann, Twort e Ingram). Si tratta qui di principi termostabili derivanti dal corpo microbico.

Dopo aver preso in esame le cause determinanti delle fasi preliminari dello sviluppo delle leptospire in cultura ci siamo rivolti con

le nostre esperienze al problema delle condizioni che stabiliscono un termine all'aumento del numero di esse, quando la cultura abbia raggiunto il suo massimo sviluppo. Come abbiamo già riferito, per questa limitazione dello sviluppo dei germi in genere sono state ammesse tre diverse cause: 1° « l'affamamento » dei germi per esaurimento delle sostanze nutritive; 2° « l'intossicazione » dei germi per opera dei propri metaboliti; 3° « l'affollamento » della cultura come causa fisica di arresto di sviluppo.

Quest'ultima causa viene esclusa dalla grandissima parte degli autori moderni. Il fatto che quasi tutti i germi formino su terreni solidi delle colonie, nelle quali l'« affollamento » è ben maggiore che in terreni liquidi, ed altre osservazioni che dimostrano la possibilità di ottenere culture più ricche del solito facendo variare qualcuna delle condizioni di cultura, hanno fatto in sostanza rigettare questa ipotesi, per lo meno per i germi che danno colonie nei terreni solidi. Per la prosecuzione delle nostre indagini si presentavano come fondamentali delle esperienze dirette a stabilire se il terreno di cultura nel quale le leptospire si erano sviluppate una volta poteva ancora servire come mezzo di cultura dello stesso germe. Furono perciò centrifugate a 3000 giri al minuto in centrifuga a tubi inclinati delle culture di leptospire giunte al massimo dello sviluppo. Se la centrifugazione viene effettuata in provette non troppo larghe (i tubi a grande diametro rallentano la sedimentazione) dopo un'ora rimangono in sospensione soltanto rare leptospire.

Nel liquido decantato lasciato a sè a 30° le leptospire si sviluppano nuovamente raggiungendo in qualche giorno (5-6) la densità della prima cultura. Questa centrifugazione può essere effettuata parecchie volte ottenendo ogni volta in meno di una settimana uno sviluppo rigoglioso. Soltanto dopo 4-5 volte lo sviluppo avviene con ritardo e in grado minore, e dopo la sesta centrifugazione viene inibito in misura nettamente apprezzabile.

Questa inibizione dello sviluppo si ottiene indipendentemente dalla concentrazione del siero, cioè delle sostanze nutritive del terreno, sebbene l'entità dello sviluppo nella prima cultura sia scarsamente influenzata da tale fattore.

Il terreno nutritivo da noi adoperato è perciò capace di dar luogo ripetutamente a sviluppo di leptospire prima che avvenga l'esau-

rimento di esso o che vi si accumulino delle sostanze tossiche in concentrazione tale da inibire lo sviluppo.

Bisognava dunque concludere che a nessuna delle cause finora considerate responsabili dell'arresto dello sviluppo nelle culture liquide poteva essere data importanza come fattore di arresto della proliferazione delle leptospire insemminate in un terreno liquido. Fu perciò ammessa l'esistenza di condizioni inibenti, le quali debbono avere un carattere fondamentale: quello della pronta scomparsa dal terreno non appena i germi vengono da questi allontanati.

A questo complesso di fattori inibenti che chiamammo « complesso biostatico » abbiamo dedicato una serie di ricerche, che permisero di dimostrarne l'esistenza anche nelle culture di altre specie microbiche, e di metterne in evidenza l'importanza biologica generale.

INFLUENZA DELL'ALTEZZA DELLO STRATO DI TERRENO LIQUIDO.

Punto di partenza della prima parte di queste ricerche è stata l'indagine sui fattori che rendono la solidificazione coll'aggiunta di sostanze gelatinose e la semina in superficie un mezzo di sfruttamento di un terreno di rendimento superiore a quello della semina dello stesso terreno non reso solido. Il rapporto fra la resa nel primo e nel secondo caso può variare da 1 : 2 fino a 1 : 4 ed oltre. L'analisi delle condizioni che cagionano questa proprietà dei terreni solidi, di certo molto numerose e complesse, ci ha portato, fra l'altro, alla constatazione che l'altezza della massa di un qualsiasi terreno liquido è uno dei fattori che influenzano spiccatamente le modalità di sviluppo dei germi.

Da questi risultati appare che anche una piccola variazione dell'altezza del liquido nutritivo (da 8 a 2 mm.) fa sì che lo sviluppo raggiunga valori notevolmente superiori.

Sullo sviluppo microbico la diminuzione dello spessore del terreno esercita dunque una netta influenza che si rivela con l'aumento della velocità dello sviluppo e della densità massima di germi raggiunta. Quali le cause di questo fatto ?

Fra i fattori che determinano questo effetto ha, a parere nostro, notevole importanza l'afflusso dell'ossigeno, che diffonde in profondità dalla superficie del brodo nutritivo in contatto con l'aria: i moti convettivi della massa liquida ne facilitano la diffusione. Più ampia è la superficie libera del liquido, rispetto al volume o più breve lo spazio fra la superficie e la base, più grande è la quantità di ossigeno che un brodo può continuare a disciogliere se l'ossigeno viene continuamente fissato dai germi.

Inutile dire che, se si lascia trascorrere il tempo necessario, un brodo non insemato in contatto con l'aria fissa la quantità di ossigeno in esso solubile, qualunque sia l'ampiezza della superficie libera: ma le cose procedono assai diversamente in una brodocultura aerobica in pieno rigoglio di sviluppo, nella quale ogni unità microbica utilizza una certa quantità di ossigeno, ed elimina nel fluido ambiente un complesso di sostanze dotate di forte attività riducente.

Nella brodocultura sviluppatasi diminuisce fortemente, a ben poca distanza dalla superficie in contatto con l'aria, la tensione dell'ossigeno, come è dimostrato in modo assai semplice dalla possibilità dello sviluppo di anaerobi in una brodocultura nella quale si insemi anche un aerobio; il forte potere riducente può persistere, come è noto, dopo la filtrazione per candela.

In una brodocultura, dunque, anche se c'è una vasta superficie libera in contatto con l'aria, i germi si sviluppano o vivono prevalentemente in condizione di micro o di anaerobiosi, se si fa eccezione per quelli che si trovano in prossimità della superficie libera. L'aumento della superficie o la riduzione dello spessore dello strato liquido sono dunque causa di una migliore aerazione di tutta la massa del brodo atta a permettere una maggiore utilizzazione delle sostanze nutritive ossidabili, e perciò di un più rigoglioso sviluppo dei germi.

Tuttavia affermare che soltanto la possibilità di penetrazione dell'ossigeno fino al fondo sia la causa del rigoglioso sviluppo microbico nelle brodoculture in strato sottile, sarebbe azzardato, data la complessità dei fattori atti ad influenzare la crescita microbica e le diverse esigenze dei microorganismi, alcuni dei quali, ad esempio, hanno bisogno per crescere delle condizioni fisiche

che si ritrovano in un liquido in prossimità della membrana superficiale (bacillo della tubercolosi).

Del resto in considerazione della nota conoscenza che i fenomeni vitali sono sempre più complessi di quanto non risulti alla nostra analisi, non si può ritenere che la maggiore disponibilità d'ossigeno sia l'unica causa, per la quale lo sviluppo dei germi in brodi in strato sottile è più rigoglioso che non in strati più alti; ma soltanto che essa costituisca uno dei più appariscenti fra i fattori che lo determinano.

La constatazione dell'influenza dell'altezza del liquido culturale sullo sviluppo microbico costituisce una premessa indispensabile alla corretta esecuzione tecnica delle ricerche su questo argomento. Di essa è stato tenuto conto nell'allestimento delle esperienze successive.

INFLUENZA DELLA CONCENTRAZIONE DELLE SOSTANZE NUTRITIVE.

La concentrazione delle sostanze nutritive nel terreno esercita una profonda influenza sullo sviluppo microbico. La composizione dei più comuni terreni culturali varia grandemente da preparazione a preparazione non soltanto per il variare della loro composizione chimica ma anche per le differenze nello stato fisico-chimico nel quale tali sostanze vengono a trovarsi nel terreno. Un metodo semplice per determinare sperimentalmente una modificazione delle proprietà nutritive del terreno è quello della diluizione. L'aggiunta di acqua al terreno nutritivo ci ha permesso di constatare che il rendimento dei terreni liquidi entro dati limiti aumenta con la diluizione.

Da queste ricerche si giunse alle seguenti conclusioni:

1° la densità assoluta della popolazione microbica entro determinati limiti cresce con l'aumento della concentrazione dei principi nutritivi;

2° la quantità assoluta di germi proliferati in un brodo cresce con la diluizione del brodo, per lo meno entro certi limiti. Se, infatti, si moltiplica il numero dei germi riscontrati in un brodo diluito per il reciproco della diluizione, si hanno cifre notevol-

mente superiori a quelle denotanti lo sviluppo nel brodo non diluito; 5° in determinate condizioni la quantità assoluta di germi in un brodo diluito è maggiore che nel brodo non diluito.

Questi fatti interessanti meritano una riflessione nell'intento di stabilirne le cause.

È indubbio che l'arresto della proliferazione microbica non è prodotto in un terreno nutritivo dall'esaurimento delle sostanze nutritive, ma da cause diverse che abbiamo raggruppato sotto la dizione di « complesso biostatico ». Maggiore è la densità della popolazione microbica, più spiccata è l'influenza del complesso biostatico.

È evidente che fino a che non avremo un'idea chiara della natura del complesso biostatico, non potremo dare una sufficiente spiegazione del fatto che lo sviluppo di una popolazione microbica si svolga meglio in un brodo più diluito.

Ha forse un certo valore esplicativo l'osservare che la disponibilità di O è proporzionalmente maggiore in un brodo diluito, nel quale la densità raggiunta dalla popolazione sia minore che in un brodo concentrato.

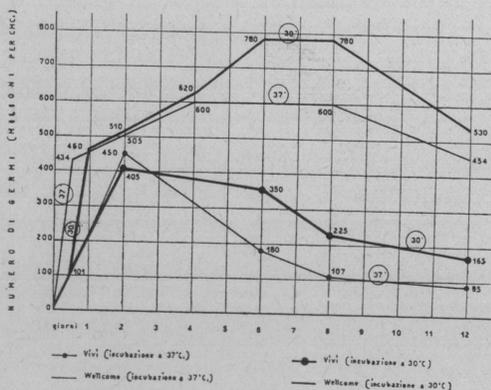
Infatti l'afflusso, a parità di volume e a parità di superficie libera in contatto con l'aria, è identico nelle due condizioni, mentre la fissazione dell'ossigeno è proporzionale al numero dei germi e quindi più forte nel brodo non diluito.

Ma certamente molti altri fattori cooperano al risultato descritto: basta pensare al fatto che nei brodi sono presenti, come vedremo, sostanze precipitabili con alcool, le quali, aggiunte in forti percentuali a un brodo normale, possono renderlo inadatto allo sviluppo della salmonella tifosa. La diluizione del brodo potrebbe rendere meno spiccata l'influenza di tali sostanze inibenti.

INFLUENZA DELLA TEMPERATURA DI INCUBAZIONE.

Risultati particolarmente interessanti ha dato la determinazione quantitativa dello sviluppo microbico in brodi mantenuti a temperatura diversa. Come dimostra il grafico, a 35° il *bacterium coli* ha dato uno sviluppo più lento ma più rigoglioso che a 37°: le diffe-

renze sono molto più sensibili dopo 6-8 giorni di crescita. Nel grafico è riportato sulle ordinate il numero dei germi (e non il suo logaritmo) per mettere meglio in evidenza le differenze fra i massimi di densità raggiunti.



Forse molti fattori esplicano una influenza sulla intensità dello sviluppo microbico a temperatura inferiore a 37°: ma uno fra essi ci sembra, anche in armonia con i dati precedentemente posti in luce, di importanza indubbia: la disponibilità di ossigeno. Si sa che la solubilità di questo come degli altri gas in acqua decresce con l'aumentare della temperatura. Benchè la differenza non sia forte, nelle culture tenute a 30° ci deve essere una migliore ossigenazione. Ma tale differenza cresce per altri fattori di importanza predominante. Man mano che dagli strati superficiali di una brodocultura l'ossigeno diffonde in profondità, viene fissato dai germi o dalle sostanze riducenti da essi elaborate: più rapido è il loro sviluppo e più completa la fissazione dell'ossigeno e, quindi, più prossima all'anaerobiosi la vita microbica delle sostanze nutritive dei terreni. Se lo sviluppo è rallentato, proporzionatamente maggiore è la disponibilità di ossigeno e, quindi, più favorevoli le condizioni di sviluppo microbico, in quanto viene meglio utilizzata la riserva di sostanze nutritive, e viene ridotta di più la influenza delle sostanze riducenti elaborate dai germi.

Tale migliore utilizzazione si deve avere anche in tutte le altre circostanze, nelle quali forzosamente la crescita microbica viene rallentata (vedi esperienze in brodo diluito).

INFLUENZA DELLA DENSITÀ
DEI GERMI VIVI E DEI GERMI MORTI.

Un'altra importante condizione che potrebbe influenzare lo sviluppo microbico è rappresentata dall'accumulo nella cultura di corpi microbici morti.

Il coefficiente di mortalità dei germi e la rapidità del processo litico che li distrugge rappresentano i due fattori che determinano il numero dei germi morti che si accumulano nel terreno.

Malgrado la sua infinita variabilità, il processo di mortalità delle popolazioni microbiche si svolge in generale secondo curve del tipo delle reazioni monomolecolari. Queste sono caratterizzate, come è noto, dal fatto che nell'unità di tempo si decompone costantemente una percentuale fissa della quantità ancora presente in quel momento, percentuale caratteristica di quelle determinate condizioni sperimentali.

L'equazione della corrispondente curva dei germi di una popolazione $p(0)$ sopravvivenenti dopo il tempo t è:

$$p(t) = p(0) e^{-\epsilon t}$$

dove ϵ varia con il tasso di mortalità.

Per quanto riguarda l'influenza degli individui morti sullo sviluppo dei vivi, il problema è stato esaminato da Kostitzin dal punto di vista matematico, per stabilire l'effetto limitante di questo fattore sullo sviluppo delle popolazioni.

Sono state prese in considerazione due eventualità: nella prima, che è soltanto teorica, lo spazio viene occupato indefinitamente dai germi morti; nella seconda, che è più aderente alla realtà, il corpo dell'individuo morto si disgrega entro un certo tempo lasciando nuovamente disponibile lo spazio da lui occupato.

Nei due casi si giunge a risultati completamente differenti. Nel primo lo spazio occupato tende a crescere e la densità della popolazione a diminuire progressivamente. Il risultato finale si esprime con la formula:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} p = 0$$

La popolazione p è perciò destinata inesorabilmente alla scomparsa. Nel secondo caso, invece, che è per noi più importante, l'analisi conduce ad ammettere la possibilità dell'esistenza della popolazione per un tempo illimitato (Kostitzin).

Qui evidentemente il problema è troppo semplificato a spese di altri fattori che limitano la moltiplicazione degli individui vivi. Nel caso delle culture microbiche la sola ipotesi che può essere presa in considerazione è la seconda, poichè i corpi microbici morti cadono rapidamente in preda alla lisi. Questa lisi è profondamente influenzata da numerosi fattori. Oltre alla costituzione chimica del terreno assumono, a questo riguardo, importanza essenziale due fattori: 1° la specie microbica; 2° le caratteristiche del ceppo usato. Esistono, ad esempio, dei ceppi di stafilococco che anche nelle culture solide hanno tendenza alla rapida lisi, che si manifesta con uno spiccato aumento di trasparenza delle colonie (Hine); 3° lo stato di aerazione del terreno; osservazioni di Jaumain hanno portato alla constatazione che una brodocultura di stafilococchi ricoperta da uno strato di olio di paraffina oppure chiusa alla lampada, diviene in 24-48 ore del tutto trasparente per la lisi dei corpi microbici contenuti. Secondo le nostre ricerche rimangono sempre nella cultura degli elementi viventi resistenti alla lisi; basta, infatti, riaprire la provetta perchè abbia luogo lo sviluppo e l'intorbidamento del brodo. Chiudendo nuovamente alla fiamma, la cultura diviene nuovamente limpida, ma non più completamente. Il fenomeno viene favorito dalla estrazione dell'aria dalla provetta con una pompa da vuoto eseguita prima della chiusura. La intensità della lisi dipende, inoltre, in misura cospicua dal ceppo usato, e per alcuni ceppi è quasi del tutto assente, come risulta da nostre osservazioni.

Molto più incompleta è la sua provocazione con germi di altre specie. È evidente che anche nelle culture aerobiche la lisi può verificarsi in misura maggiore o minore a seconda dell'altezza dello strato di terreno liquido.

I rapporti fra la velocità di sviluppo dei germi e la presenza di germi morti hanno rappresentato il tema di una serie di ricerche in base alle quali siamo giunti alle seguenti conclusioni:

1° La massa di germi morti presente dopo 48 ore di sviluppo in una brodocultura di *bacterium coli* non basta ad impedire lo sviluppo dei microorganismi perchè, portata con i germi in un nuovo brodo, non inibisce lo sviluppo.

2° In condizioni di semina eccezionalmente abbondante il massimo della densità di germi vivi non è aumentato in modo sensibile oltre il limite cui si può arrivare con una semina modesta: soltanto viene raggiunto più rapidamente il più alto livello possibile. Questa osservazione porta una chiara conferma alla legge logistica di Verlhüst, secondo la quale una popolazione chiusa tende verso un limite indipendente dal valore iniziale.

3° L'azione batteriostatica viene raggiunta presso a poco sempre nelle stesse condizioni, cioè quando in un brodo si è raggiunta una certa densità: densità uguali di germi, anche se ottenute in tempi diversi e con diverso numero di divisioni successive, esplicano infatti la medesima azione batteriostatica.

4° Su questa non esercita un'azione evidente la presenza di un certo numero di germi morti.

5° L'azione batteriostatica è con probabilità molto complessa: essa è data dalla presenza in un brodo di un determinato numero di germi vivi (quelli morti non sembrano spiegare nessuna influenza, o se mai ne esplicano una trofica) oppure è l'effetto di un complesso di modificazioni della costituzione del terreno, in gran parte labili perchè il reinseminamento dà buono sviluppo.

6° La durata media della vita dei germi è minore in brodoculture più largamente insemenate.

Fra le ipotesi che sono state avanzate per spiegare l'arresto dello sviluppo dei germi in cultura, una delle più importanti è quella che lo attribuisce ad alcuni prodotti secondari allo sviluppo o materiali di escrezione o autotossine specifiche (Eijkman, Kahn, McLeod e Gordon ecc.).

Kostitzin ha elaborato i dati ottenuti da Reignier nello studio di culture microbiche, supponendo con Volterra che l'azione tossica sulla natalità e sulla mortalità si esprima introducendo nel secondo membro dell'equazione logistica un termine integrale.

Per $t = \infty$ p si annulla, ciò che significa che la popolazione (p) tende a scomparire in un tempo (t) molto grande: per t sufficientemente piccolo invece p aumenta. Esiste dunque un valore massimo della popolazione che viene raggiunto in un tempo finito. Applicando questi risultati alle osservazioni sperimentali di Reignier sul colibacillo e sullo stafilococco, Kostitzin ha ottenuto

	P_m	t_m	c
<i>Bacterium coli</i>	$3.992 \cdot 10^6$	30 ore	0,025
Stafilococco	$5.366 \cdot 10^6$	30 ore	0,0265

Il coefficiente d'intossicazione c è quasi uguale per le due specie studiate, il che fa ritenere a Kostitzin che « si tratti di un fenomeno chimico verso il quale i due microorganismi reagiscono quasi identicamente ». I dati sperimentali danno una sensibile deviazione dai valori calcolati fra l'8^a e la 24^a ora di sviluppo. Tale deviazione è di segno negativo per ambedue le specie, e viene attribuita da Kostitzin alla mancanza di spazio e alla mancanza di sostanze alimentari.

Partendo dalla constatazione che alcuni germi coltivati in terreni liquidi perdono la loro virulenza dopo 24 ore di cultura, Besredka ha elaborato il concetto di *antivirus* inteso come una sostanza contenuta nel corpo microbico accanto al *virus* patogeno, la quale si comporta verso il *virus* stesso come un principio antagonista specifico. L'*antivirus* sarebbe filtrabile e, a differenza del *virus*, atossico e termostabile.

Le proprietà dell'*antivirus* sono, secondo Besredka, dimostrabili anche *in vitro*. « Filtrando per candela una brodcultura di stafilococco, si ottiene un liquido poco diverso dal brodo comune. Seminando in esso vari germi, si ha sviluppo rigoglioso come nel brodo normale. Se invece si riseminano in questo liquido degli stafilococchi, si ha sviluppo nullo o scarso. Questi germi vi restano vivi, ma non sono più capaci di svilupparvisi ».

« Il filtrato può essere scaldato 30 minuti a 100° o 20 minuti a 120° senza perdere le sue proprietà ».

Dalle nostre ricerche risulta che *l'antivirus non esiste*: non è cioè dimostrabile in alcun modo che i comuni germi patogeni elaborino un *quid* di natura biologica (non identificabile con cataboliti acidi o alcalini) persistente dopo l'asportazione dei germi e dopo riscaldamento, e dotato di azione inibente specifica sulla proliferazione dei germi. Le semine ripetute in uno stesso terreno ogni volta privato dei germi proliferati mediante filtrazione o centrifugazione, danno luogo a sviluppo man mano più scarso, anche dopo correzione del pH, a causa dell'esaurimento del terreno stesso. Nei liquidi così ottenuti non sono dimostrabili sostanze immunologicamente attive ad eccezione di apteni microbici. Non si può escludere che il potere terapeutico specifico attribuito a tali filtrati sia da riferire all'azione di questi semiantigeni sull'organismo infetto o allergico.

Anche la ricerca di fattori autotossici termolabili dette risultati negativi. Nel brodo servito per la cultura ed anche, sebbene meno facilmente dimostrabili, nel brodo nuovo furono dimostrate sostanze alcool-precipitabili capaci di inibire in determinate concentrazioni lo sviluppo microbico.

* * *

Un'altra serie di indagini condotte sempre nell'intento di studiare i fattori che intervengono nella regolazione dello sviluppo microbico ci condusse ad alcune osservazioni sul fenomeno della sporulazione, dalle quali risultò confermata ed ampliata l'importanza del complesso biostatico.

L'ossigeno esercita una notevole influenza sulla formazione delle spore. Mediante una semplice esperienza abbiamo cercato di vedere se questo fattore fosse utilizzabile per ottenere un'abbondante sporificazione in terreni liquidi. A tale scopo abbiamo seminato un germe sporigeno aerobio (*Bacillus subtilis*) in 10 cc. di brodo contenuto in provette di circa 1,5 cm. di diametro e, d'altra parte, in piccole piastre di Kolle di circa 8 cm. di diametro. Nelle provette il liquido raggiungeva un'altezza di circa 6 cm., nella piastra invece soltanto 2-3 mm.

Le culture vennero poste in camera umida per evitare che l'evaporazione durante l'incubazione a 37° modificasse i risultati della ricerca. I risultati delle prove eseguite con acqua peptonata dimostrano che, mentre nelle provette non si formano spore resistenti al riscaldamento a 70° per 30 minuti, nelle piastre di Kolle si osserva dopo 48 ore una ricca sporulazione. Anche in brodoculture la sporulazione viene favorita dalla distribuzione in basso strato. In base a questi risultati, nelle seguenti ricerche abbiamo costantemente usato terreni liquidi distribuiti in piastre di Kolle del diametro suindicato, che ci permettevano di ottenere la formazione di numerose spore. Perciò ognuna delle esperienze seguenti rappresenta una conferma del fatto, del resto già noto, che l'ossigeno esplica una spiccata influenza sulla sporificazione. Ciò fa pensare che per la formazione di spore dai germi aerobi siano necessari intensi processi ossidativi. Si ignora, però, se tale intensa respirazione sia necessaria alla sporogenesi direttamente, ovvero indirettamente, in quanto costituisce una condizione ottimale per la vita dei germi. Attualmente ci troviamo nell'impossibilità di risolvere sperimentalmente questo problema, poichè non siamo in condizioni di seguire i processi enzimatici che si svolgono nei germi durante la formazione delle spore.

FASE DI LATENZA DELLA SPORULAZIONE.

La sporulazione, o almeno la produzione di spore differenziabili dalle forme vegetative per la loro resistenza alla temperatura di 70°,

non ha inizio subito dopo la semina, ma soltanto dopo un certo intervallo di tempo.

Evidentemente la determinazione di tale intervallo, durante il quale si svolgono i processi che portano alla sporulazione, ha importanza notevole.

Per il *bacillus subtilis* le numerose determinazioni da noi eseguite hanno permesso di stabilire una durata della fase di latenza di 10-12 ore. Si noti che nelle nostre ricerche la semina veniva eseguita con culture prive di spore. Questo periodo di latenza ha uguale durata nelle brodoculture e nelle culture in acqua peptonata, sebbene le forme vegetative si sviluppino molto più rapidamente in brodo e perciò impieghino tempi molto diversi per raggiungere nei due terreni la stessa densità.

Considerando tali risultati ci sembrò opportuno di determinare il periodo di latenza in condizioni nelle quali lo sviluppo avviene anche più rapidamente che nel brodo. Furono seminate delle piastre di agar e fu determinato ogni ora il numero delle spore presenti; anche in questo caso si constatò una durata della latenza di circa 11 ore.

Da questi risultati appare evidente che almeno per il ceppo di *bacillus subtilis* studiato, la fase di latenza della sporulazione ha una durata pressochè costante anche se lo sviluppo sui diversi terreni usati avviene con velocità molto diversa.

VELOCITÀ DI SPORULAZIONE.

Nel corso di queste ricerche potemmo effettuare anche la seguente constatazione: trascorso il periodo di latenza e formatesi le prime spore, il numero di queste per alcune ore aumenta assai lentamente. Ciò dimostra che la capacità di sporulazione non si manifesta contemporaneamente in tutti gli elementi viventi in una cultura microbica. Al principio, anzi, la tendenza a sporificare si manifesta solo in una piccola parte dei germi. A poco a poco il numero delle spore formatesi nell'unità di tempo cresce fino ad un massimo per diminuire poi fino alla scomparsa di tutte le forme vegetative. Questo comportamento, di cui abbiamo tentato una rappresenta-

zione matematica, dimostra che la tendenza dei germi alla sporulazione è distribuita secondo una curva campaniforme, come avviene per molti caratteri biologici, come ad esempio la mortalità dei germi in cultura, processo che sotto molti aspetti si avvicina alla sporogenesi.

FATTORI ESSENZIALI DELLA SPORULAZIONE.

Per il proseguimento del nostro studio ritenemmo opportuno formulare due ipotesi di lavoro sui fattori essenziali della sporificazione. La prima di tali ipotesi può essere così formulata: i prodotti di secrezione e di autolisi dei germi sporigeni accumulatisi nel terreno potrebbero agire sulle forme vegetative stimolandole alla produzione di spore.

Le nostre ricerche furono dapprima dirette a provare la fondatezza di tale prima ipotesi; poichè ritenevamo che anche l'insuccesso di tali indagini avrebbe avuto importanza notevole, in quanto ci avrebbe indotto a prendere in esame la seconda ipotesi, cioè a indagare se fattori intrinseci, legati strettamente al processo di sviluppo e di divisione del germe, non rappresentassero anche i fattori essenziali della sporogenesi.

Secondo quest'ultima ipotesi gli stimoli esterni al germe avrebbero un'importanza relativa, in quanto la loro azione si limiterebbe tutt'al più alla stimolazione dei fattori intrinseci della sporogenesi. Le ricerche che effettuammo allo scopo di mettere in evidenza nei terreni serviti allo sviluppo e alla sporulazione del *bacillus subtilis* la presenza di elementi atti a provocare la sporulazione, furono numerosissime. Malgrado i tentativi effettuati con diverse tecniche ci fu però impossibile dimostrare, dopo la seconda o la terza semina di tali terreni, un aumento delle spore formate in confronto a quelle prodotte dopo la prima semina; in altre parole non fu possibile dimostrare nel terreno dei principi stimolanti la sporogenesi. Venimmo, perciò, nella convinzione che fra processi proliferativi del germe e processo sporogenetico esistessero stretti rapporti, nei quali va ricercata la causa della sporulazione.

In realtà è evidente che queste due proprietà, la proliferativa e la sporogenetica, sono da ritenere nettamente antitetiche. La ten-

denza alla proliferazione viene determinata da un orientamento metabolico (causato da principi nutritivi contenuti in quantità e in forma adatta nell'ambiente), che esclude lo svolgersi del processo sporogenetico.

I fattori che inibiscono lo sviluppo delle spore potrebbero, perciò, rappresentare lo stimolo che provoca la formazione delle spore. Modificando lievemente il concetto si può dire che la diminuzione dello stimolo alla continua assimilazione, fattore essenziale della proliferazione, permette il manifestarsi della tendenza sporogenetica, che altrimenti viene costantemente inibita dai processi assimilativi. Soltanto allora il germe viene indotto ad assumere una forma, nella quale il diminuito rapporto superficie: volume rende lento e difficile il ricambio; le sostanze contenute nel corpo batterico vengono condensate mediante disidratazione, in un piccolo corpicciuolo sferico o ellittico e i processi metabolici vengono estremamente ridotti.

Il complesso biostatico è indubbiamente il più fisiologico fra i fattori che esercitano un'azione inibente sullo sviluppo microbico; ed essendo presente nelle culture nelle quali si formano le spore, potrebbe rappresentare un importante fattore di questo processo, almeno per la sua influenza del processo proliferativo.

Per mettere in evidenza i rapporti fra sporulazione e complesso biostatico, abbiamo allestito una serie di ricerche nelle quali venivano seguite le modificazioni del tempo di generazione durante la fase nella quale si svolge la sporogenesi. Venne determinato il tempo di generazione del *bacillus subtilis* in acqua peptonata dal momento della semina fino alla comparsa delle spore. Allo scopo ci siamo serviti della formula

$$g = \frac{t \log 2}{\log b - \log B}$$

dove t = tempo; B = numero dei germi per $t = 0$; b = numero dei germi per un qualsiasi valore di t ; g = tempo di generazione.

Nelle nostre condizioni d'esperienza il tempo minimo di generazione (fra la 3^a e la 7^a ora) fu notevolmente più breve di quello

calcolato da altri autori. A spiegare tale differenza potrebbe essere invocato il fatto che noi eseguiamo la cultura in basso strato.

TEMPO DI GENERAZIONE E SPORULAZIONE
IN CULTURE DI « *BACILLUS SUBTILIS* »

Ore dalla semina	Numero di germi per cc.	tempo di generazione $t = \frac{\log 2}{\log b - \log B}$	N. di spore per cc.
0	5.780 *	57'	< 0,5
5	105.000 *	51'	< 0,5
6	5.450.000 *	28'	< 0,5
9	475.000.000 **	518'	< 0,5
11	700.000.000 **		85

* = dati ottenuti con il conteggio dei germi vivi.

** = dati ottenuti con il conteggio fotometrico.

In base ai dati ottenuti si può affermare, almeno riguardo al ceppo da noi usato, che la sporificazione inizia nella fase in cui il tempo di generazione per azione del complesso biostatico subisce un aumento cospicuo.

Ciò spiega anche perchè la fase di latenza della sporulazione sia pressochè della stessa durata anche in terreni nei quali i germi hanno una velocità di sviluppo diversa: infatti, nonostante le diverse condizioni di sviluppo, l'allungamento del tempo di generazione avviene pressappoco allo stesso momento.

Da questa constatazione risulta confermata l'importanza del complesso biostatico per la conservazione della specie, che si manifesta sia impedendo un eccessivo addensamento dei germi, sia provocando la sporulazione.

Anche la produzione di forme resistenti dipende dunque dall'influenza del complesso biostatico al quale va riconosciuta una

grande importanza per la vita delle popolazioni microbiche, anche se la sua natura ci è per ora ignota.

Malgrado queste constatazioni l'intimo meccanismo della sporogenesi rimane oscuro: come manifestazione di una proprietà vitale del germe essa resterà inspiegabile finchè anche il meccanismo dei processi metabolici non verrà posto completamente in luce.

CONCLUSIONI

Dai risultati delle suesposte ricerche si può concludere:

1° I germi possono moltiplicarsi rigogliosamente più volte di seguito nello stesso terreno liquido, se le culture vengono ogni volta liberate mediante centrifugazione dei germi già proliferati.

L'arresto della loro moltiplicazione quando la popolazione ha raggiunto una data densità, non è dunque causato nè dall'esaurimento del terreno nutritivo, nè dall'accumularsi in esso di sostanze del tipo dell'*antivirus* (non eliminabili con la centrifugazione), bensì da condizioni inibenti che si creano nelle culture liquide giunte al massimo sviluppo e che prontamente scompaiono quando i germi vengono da esse allontanati. A questo complesso inibente abbiamo dato il nome di *complesso biostatico*.

2° Sulla natura di questo complesso di condizioni batteriostatiche che si crea nelle culture liquide giunte al massimo del loro sviluppo, nulla di preciso può essere affermato.

Dall'insieme dei risultati si può soltanto dedurre l'estrema complessità dell'azione biostatica, che pare conseguenza di modificazioni del terreno in parte labili, nel cui determinismo intervengono i germi vivi, quando superano una determinata densità, indipendentemente dal numero dei germi morti.

3° L'azione biostatica appare di grande utilità per le specie che la presentano, perchè impedisce l'esaurimento del terreno nutritivo, e quindi vi permette una lunga sopravvivenza dei germi.

Infatti la proliferazione subisce una forte inibizione assai prima che le condizioni dei terreni nutritivi diventino veramente inadatte per l'esaurimento dei principi nutritivi; i germi possono quindi continuare a crescerci con grande lentezza, o per lo meno,

data l'assenza di principi antagonisti, mantenersi vivi assai più a lungo di quanto non comporti la durata della vita del singolo germe. Tale significato biologico del complesso biostatico viene ancor meglio dimostrato dalla sua funzione sporogenetica.

Nei metazoi e nei metafiti l'arresto della proliferazione di tessuti ad elementi labili, quando il loro numero abbia raggiunto il limite fisiologico, si deve all'intervento di fattori analoghi a quelli che regolano il numero dei germi in una cultura liquida. Ambedue i processi di limitazione della crescita rispondono alla stessa necessità biologica, ed ambedue rendono possibile la conservazione degli individui e della specie, che senza di essi sarebbe compromessa irrimediabilmente. Sarà assai interessante mettere in luce con quali mezzi viene raggiunta questa regolazione essenziale per la vita, la cui importanza è resa manifesta dal sorgere di un tumore maligno, il quale, pur essendo nell'origine limitato a una o poche cellule che non obbediscono a questa legge generale di sviluppo, ciò non di meno è sempre causa di morte.

BIBLIOGRAFIA

- ALDERSHOFF H., « Zbl. f. Bakt. I. Orig. », 112, 275 (1929).
BESREDA A., « Jour. of Immun. », 25, 349 (1952).
BREDEMAN G., « Zbl. f. Bakt. I. Orig. », 25, 385 (1909).
BUCHANAN K. F., « Journ. inf. Dis. », 25, 100 (1918).
BUCHANAN K. F., FULMER E. J., *Physiology and biochemistry of bacteria*. Ed. Baillière, London, 1928.
CARLINFANTI E., « Annali d'Ig. », 52, 15 (1952).
CHAILLOT L., « C. R. Soc. Biol. », 103, 122 e 206 (1950).
CHESNEY A. M., « Jour. exp. Med. », 24, 587 (1916).
CHIKHANOFF H., « C. R. Soc. Biol. », 98, 281 (1928).
CLEARY J. P., BEARD P. J., CLIFTON C. E., « Jour. of Bact. », 29, 205 (1955).
COOK R. P., « Zbl. Bakt. I. Orig. », 122, 529 (1951).
CRAMER M., « Zbl. f. Bakt. I. Orig. », 151, 508 (1954).
DARANYI V. J., « Zbl. f. Bakt. I. Orig. », 102, 526 (1927); 117, 545 (1950). II. Ref. 71, 555 (1927).
DEL VIVO G., « Gior. di Dermatol. », 68, 1555 (1927).
DE ZEEUW F. A., *Thèse Méd. Véter. Utrecht*, 1952. [Riass. in « Bull. Inst. Pasteur », 52, 460 (1954)].
DOLD H., MUELLER H. R., « Ztschr. f. Immun. forsch. », 56, 547 (1928).

- EPSTEIN E., « Wien. klin. Wschr. », 40, 775 (1927).
- FABIAN F. W., BRYAN C. S., « Jour. of Bact. », 26, 545 (1955).
- FABIANI G., « C. R. Soc. Biol. », 116, 212 (1954).
- FITZGERALD M. P., « Jour. of Path. a. Bact. », 15, 147 (1911).
- FULMER E. J., « Jour. Physiol. Chem. », 25, 455 (1921).
- GOLDIE H., « C. R. Soc. Biol. », 109, 7 (1952).
- GOLDIE H., VEINBERG S., « C. R. Soc. Biol. », 110, 895 (1952).
- GRUNBACH A., « Ztschr. f. Immun. Forsch. », 57, 557 (1928).
- HALLER O., « Vestn. Mikrobiol. », 17, 45 (1959). [Riass. in « Ber. ü. wiss. Biol. », 55, 701 (1941)].
- HENRICI A. T., *Morphologic variations and the rate of growth of bacteria*. Ed. Baillière, London, 1928.
- HERSHEY A. D., « Jour. of Bact. », 57, 285 (1959).
- HINE T. G. M., « The Lancet », 2, 1580 (1922).
- HOLZMUELLER, « Zbl. f. Bakt. », II, Ref. 25, 304 (1909).
- KOSTITZIN V. A., *Biologic mathématique*. Ed. Colin, Paris, 1957.
- ILITSCH Z., DURAN-REYNALS F., « C. R. Soc. Biol. », 94, 1176 (1926).
- JAUMAIN D., « C. R. Soc. Biol. », 87, 790 (1922).
- LANE-CLAYTON J. E., « Jour. Hyg. », 9, 239 (1909).
- LEHMANN K. B., cit. in « Kolle u. Uhlenhuth ».
- LEIFSON EINAR, « Jour. of Bact. », 21, 551 (1951).
- LOTKA A. J., *Théorie analytique des associations biologiques*. Ed. Hermann, Paris, 1954.
- LOUROS, GAESSLER, « Zbl. f. Bakt. I. Orig. », 104, 556 (1927).
- MALYSCHewa L., « Jour. exp. Med. » (russo), 11, 29 (1929). [Riass. in « Zbl. f. Bakt. Ref. », 99, 296 (1950)].
- MARCEWSKI M., « Wiadomosci Veter. », febr. 1956. [Riass. in « Bull. Inst. Pasteur », 55, 218 (1957)].
- MATZUSCHITA, « Arch. f. Hyg. », 45, cit. in « Kolle u. Uhlenhuth ».
- MEYER A., « Zbl. f. Bakt. », I. Orig., 49, 305 (1909).
- MONOD J., « C. R. Ac. Sciences », Paris, 212, 771 e 934 (1941).
- MURAO K., MARIMOTO T., « Zbl. f. Bakt. », I. Orig., 157, 210 (1956).
- NINNI C., MOLINARI G., « Gior. Batt. e Immun. », 6, 256 (1951).
- OESTERLEIN E., « Zbl. f. Bakt. I. Orig. », 142, 475 (1938).
- OHBA S., TAKEKAWA H., « C. R. Soc. Biol. », 105, 1069 (1950).
- OSBORNES, « Arch. f. Hyg. », 9, 51, cit. in « Kolle u. Uhlenhuth ».
- PEARL R., *The biology of population growth*. Ed. Knopf, New York, 1925, cit. da Henrici.
- PETRAGNANI G., « Atti Congr. Naz. Microb. », p. 296 (1951).
- PREISZ H., « Zbl. f. Bakt. », I. Orig., 55, 657 (1904).
- RAHN O., « Zbl. f. Bakt. », II. Orig., 16, 417 e 469 (1906).
- REICNIER M. J., cit. da Kostitzin.
- REITANO U., « Pathologica », 51, 285 (1959).
- RENAUX D., *Immunité locale*. Ed. Soc. d'impr. typogr., Nancy, 1954.
- RENAUX E., « Bruxelles Méd. », 8, 1455 (1928).
- RONDONI P., « Lo sperimentale », 78, 509 (1924).

- SCHIOPPA L., « Boll. I. S. M. », 15, 266 (1954).
SCHUBERT H., « Erg. der Hyg. Bakter. », 22, 69 (1959).
SCHWEINBURG F., « Wien. klin. Woch. », 40, 811 (1927).
SCHWEINBURG F., « Ztschr. f. Immun. forsch. », 58, 53 (1928).
STEPHENSON M., *Bacterial metabolism*. New York, 1959.
STEPHRANDIS, « Arch. f. Hyg. », 55, 1; cit. in « Kolle u. Uhlenhuth ».
STIGELL R., « Zbl. f. Bakter. », I. Orig., 45, 487 (1908).
TARR L. A., « Jour. of Hyg. », 52, 555 (1952).
TZEKHNOVITZER M., GOLDENBERG I., TZOUVERNALOV D., « C. R. Soc. Biol. », 98, 357 (1928).
VOLTERRA V., *Leçon sur la théorie mathématique de la lutte pour la vie*. Ed. Gauthiers-Villars, Paris, 1931.
WEICHARDT W., « Klin. Woch. », 6, 1555 (1927).
WILLIAMS O. B., « Proc. Soc. exper. Biol. Med. », 28, 615 (1950).
ZIRONI A., « Boll. I. S. M. », 1, 267 (1920).
ZIRONI A. e CARLINFANTI E., « Zbl. f. Bakt. », I. Orig., 147, 242 (1941); 148, 245 (1942); 149, 142 (1942); « Boll. I. S. M. », 20, 51 e 355 (1941); 21 (1942).

RIASSUNTO

Gli AA. riassumono le loro ricerche sui fattori che regolano lo sviluppo microbico. Nelle culture in sviluppo avanzato si dimostra, prima dell'esaurimento dei principi nutritivi, l'esistenza di un complesso di condizioni batteriostatiche non identificabili con la presenza di cataboliti acidi o alcalini o di sostanze tipo *antivirus*. Inibendo la moltiplicazione e provocando la sporulazione questo complesso biostatico esercita sui germi un'azione fisiologica utile alla conservazione della specie.

97869

~~348172~~

Esemplare fuori commercio per
la distribuzione agli effetti di
legge.

