

Roberto Ligrone*

**Ultrastruttura di un *Thiobacillus* isolato
dalle fumarole calde dei Campi Flegrei (Napoli).**

Un ceppo di *Thiobacillus* fu isolato da MORETTI & PINTO (1975) da ambienti solfatarici dei Campi Flegrei. Per la sua estrema acido-tolleranza esso apparve ascrivibile alla specie *Th. thiooxidans* Waksman & Joffe (1921). Tuttavia la presenza in questo ceppo di alcune differenze rispetto al *Th. thiooxidans*, riguardanti in particolare i tempi di latenza a varie temperature e la capacità di crescere anche su mezzi solidi, sollevò dubbi sulla sua collocazione sistematica. Gli AA. perciò lo indicarono provvisoriamente come *Th. thiooxidans* ceppo Campi Flegrei, nell'attesa di ulteriori dati che consentissero di stabilire se esso dovesse ritenersi una varietà del *Th. thiooxidans* oppure una nuova specie.

Nel presente lavoro vengono riferiti i risultati di un'indagine ultrastrutturale sul ceppo Campi Flegrei. Allo scopo di eseguire una più attendibile comparazione tra questo ed il *Th. thiooxidans*, è stato sottoposto ad esame ultrastrutturale anche il ceppo tipo di tale specie, attraverso le medesime procedure.

MATERIALI E METODI

Il ceppo tipo di *Th. thiooxidans* Waksman & Joffe proviene da *The American Type Culture Collection* (n. 19377).

* Istituto di Botanica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli (Italia).

Entrambi i ceppi sono stati coltivati in ambiente termostato a 30° C (MORETTI & PINTO, 1975), in beute contenenti terreno di VÖGLER & UMBREIT (1941) poste su piano oscillante.

Cellule raccolte sia da colture in fase esponenziale che da colture in più avanzati stadi di crescita sono state fissate con aldeide glutarica al 3% in tampone fosfato 0,05 M a pH 6,8 per 30 minuti e postfissate con OsO₄ all'1% nello stesso tampone per un'ora.

Dopo disidratazione il materiale è stato incluso in Epon 812. Sezioni ultrasottili sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo.

Vari campioni dei due ceppi sono stati sottoposti a colorazione negativa con acido fosfotungstico (PTA) all'1-2% a pH 7.

Le osservazioni sono state eseguite mediante un microscopio Siemens Elmiskop IA, presso il Centro di Studio di Microscopia Elettronica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Ceppo Campi Flegrei (Tav. I).

Lunghe 1,5-2 µm e larghe 0,4-0,7 µm, le cellule hanno forma bacillare, spesso caratterizzata da un'estremità più affusolata (fig. 1). Sono molto comuni peraltro, in campioni provenienti da colture in fase stazionaria, cellule assai più lunghe (fig. 5), probabilmente a causa delle sfavorevoli condizioni di crescita che inibiscono la divisione cellulare.

La parete ha generalmente profilo irregolare ed è caratterizzata dalla presenza di due strati ben distinti: uno esterno, spesso circa 8 nm, in cui ad elevati ingrandimenti è possibile

notare una substruttura tripartita, ed uno interno, situato fra lo strato esterno ed il plasmalemma. Lo strato interno appare fortemente elettrodenso ed ha uno spessore di 6-7 nm (fig. 2).

Il protoplasma è ricco di ribosomi, per lo più disposti perifericamente, e di granuli di polifosfati (volutina) (figg. 1, 2). Alle estremità delle cellule, inoltre, sono piuttosto comuni depositi locali di materiale elettrodenso, generalmente raccolti in grosse masse sferoidali (fig. 1). Appare probabile che simili strutture corrispondano ai « corpi densi » osservati da SHIVELY, DECKER & GREENAWALT (1970) in varie specie di *Thiobacillus*.

Oltre a queste inclusioni si osservano corpi con profilo poligonale, mediamente opachi agli elettroni, le cui dimensioni variano fra 60 e 100 nm (figg. 1, 3, 5). Strutture di tal tipo sono state descritte in varie specie di *Thiobacillus*, batteri nitrificanti ed alghe azzurre (SHIVELY, 1974).

In base a studi su *Th. neapolitanus* esse sono state denominate carbossisomi da SHIVELY, BALL & KLINE (1973) perché costituite prevalentemente da RUDP carbossilasi allo stato paracristallino. Questo dato è stato confermato nelle alghe azzurre (STEWART & CODD, 1975; CODD & STEWART, 1976).

In accordo con SHIVELY e coll. (1973) i carbossisomi osservati nel ceppo Campi Flegrei appaiono delimitati da un involucro esterno, denso agli elettroni (fig. 3).

Il numero di carbossisomi per cellula appare assai basso o nullo nelle colture in fase esponenziale (fig. 1), mentre tende ad aumentare con l'invecchiamento (fig. 5). Sezioni seriali su campioni provenienti da colture in avanzata fase stazionaria hanno permesso di osservare cellule che ne contenevano alcune decine. Osservazioni simili sono state fatte da SHIVELY e coll. (1970) in varie specie di *Thiobacillus*.

L'incremento del numero di carbossisomi per cellula non è strettamente correlato all'aumento delle dimensioni cellulari che accompagna l'invecchiamento delle colture. Infatti nelle cellule in fase stazionaria il rapporto fra numero di carbossisomi e mas-

sa protoplasmatica risulta in media nettamente più alto rispetto alle cellule in fase esponenziale.

Non è ancora chiaro se i carbossisomi svolgano un ruolo diretto nella fissazione della CO₂, come suggeriscono SHIVELY e coll. (1973), o rappresentino una forma di riserva della RUDP carbossilasi in uno stato verosimilmente non funzionale (CODD & STEWART, 1976).

I risultati ottenuti, tuttavia, sembrano confermare la seconda ipotesi, poiché mostrano l'esistenza di una correlazione fra l'aumento del numero di queste strutture e le cattive condizioni di crescita che s'instaurano nelle colture durante l'invecchiamento, con particolare riferimento al notevole abbassamento del pH del mezzo (dovuto alla ossidazione del substrato solforato) ed alla conseguente diminuzione della concentrazione della CO₂.

L'applicazione della colorazione negativa ha consentito di accertare che le cellule del ceppo Campi Flegrei sono provviste di un flagello polare, con un diametro di circa 13 nm. Non è stato possibile misurare con esattezza la lunghezza di questo organulo perché, a causa della sua estrema fragilità, esso si frammenta assai facilmente nel corso delle procedure di contrasto.

Thiobacillus thiooxidans Waksman & Joffe (Tav. II).

L'esame di un gran numero di cellule non ha consentito di rilevare alcuna differenza ultrastrutturale significativa fra questa specie ed il ceppo Campi Flegrei (figg. 8, 9). In particolare, per quanto concerne la parete, questa si presenta del tutto eguale nei due ceppi (Tav. I, fig. 2; Tav. II, fig. 7). Analogamente, le cellule del *Th. thiooxidans* sono provviste di un lungo e fragile flagello polare (fig. 6).

In alcuni casi è stato possibile osservare un vistoso corpo lamellare, costituito da 6-10 dense bande sovrapposte, ciascuna con uno spessore di circa 10 nm (fig. 8). Una struttura di

questo tipo è stata sinora descritta solo in *Th. thioparus* (SHIVELY e coll., 1970; HOLT, SHIVELY & GREENAWALT, 1974) e nulla è noto circa il suo significato funzionale.

CONCLUSIONE

Le varie specie appartenenti al genere *Thiobacillus* presentano una morfologia ultrastrutturale assai uniforme. Uno dei pochi caratteri discriminatori è la struttura della parete cellulare, che varia sensibilmente da una specie all'altra, soprattutto per quanto concerne la presenza e lo spessore dello strato interno (SHIVELY e coll., 1970).

I risultati delle osservazioni su *Th. thiooxidans* Waksman & Joffe appaiono concordi con le descrizioni di questa specie esistenti in letteratura (MAHONEY & EDWARDS, 1966; SHIVELY e coll., 1970). D'altra parte i caratteri ultrastrutturali del ceppo Campi Flegrei, con particolare riferimento alla morfologia della parete ed alla presenza di un flagello, su cui esistevano dubbi prima dell'esame ultrastrutturale (MORETTI & PINTO, 1975), non mostrano alcuna differenza rispetto al *Th. thiooxidans*.

L'assenza di corpi lamellari nel ceppo Campi Flegrei non sembra doversi ritenere rilevante perché, data la bassissima frequenza con cui queste formazioni compaiono nel ceppo tipo di *Th. thiooxidans*, la loro eventuale presenza nel ceppo Campi Flegrei potrebbe facilmente essere sfuggita all'osservazione. D'altronde la segnalazione di strutture analoghe nel *Th. thioparus* (SHIVELY e coll., 1970; HOLT e coll., 1974) dimostra che esse non costituiscono un carattere specifico.

I risultati ottenuti inducono perciò a ritenere che il ceppo Campi Flegrei vada ascritto al *Th. thiooxidans* Waksman & Joffe, di cui potrebbe rappresentare una varietà selezionata dalle particolari condizioni che caratterizzano l'ambiente da cui proviene.

RINGRAZIAMENTI

L'Autore rivolge un vivo ringraziamento al dr. A. Moretti ed al dr. G. Pinto, che gli hanno gentilmente fornito i ceppi. Ringrazia inoltre i tecnici del Centro di Studio di Microscopia Elettronica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli per la loro competente collaborazione.

RIASSUNTO

Vengono riferiti i risultati di uno studio ultrastrutturale su di un ceppo di *Thiobacillus* isolato dalle fumarole calde dei Campi Flegrei (Napoli).

L'ultrastruttura di questo ceppo viene inoltre confrontata con quella del ceppo tipo del *Th. thiooxidans* Waksman & Joffe. L'esistenza di sostanziali affinità fra essi induce l'Autore a ritenere che il ceppo proveniente dai Campi Flegrei debba essere attribuito a tale specie, della quale esso potrebbe costituire una varietà.

SUMMARY

The results of an ultrastructural study on a strain of *Thiobacillus* coming from the warm fumaroles of the Campi Flegrei (Napoli) are referred.

Moreover the ultrastructure of this strain is compared with the one of the type strain of *Th. thiooxidans* Waksman & Joffe. The existence of some substantial affinities between them leads the Author to believe the strain isolated from the Campi Flegrei is to be ascribed to this species, of which it might represent a variety.

BIBLIOGRAFIA

- CODD G. A. & W. D. P. STEWART, 1976. *Polyhedral bodies and ribulose 1,5-diphosphate carboxylase of the blue-green alga Anabaena cylindrica*. *Planta*, **130**: 323-326.
- HOLT S. C., J. M. SHIVELY & J. W. GREENAWALT, 1974. *Fine structure of selected species of the genus Thiobacillus as revealed by chemical fixation and freeze-etching*. *Can. J. Microbiol.*, **20**: 1347-1351.
- MAHONEY R. P. & M. R. EDWARDS, 1966. *Fine structure of Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.*, **92**: 487-495.
- MORETTI A. & G. PINTO, 1974-1975. *Prime osservazioni sulla fisiologia di un ceppo di Thiobacillus thiooxidans di ambienti solfatarici*. *Delpinoia*, n. s., **16-17**: 193-199.
- SHIVELY J. M., G. L. DECKER & J. W. GREENAWALT, 1970. *Comparative ultra-structure of the Thiobacilli*. *J. Bacteriol.*, **101**: 618-627.
- , F. L. BALL & B. W. KLINE, 1973. *Electron microscopy of the carboxisomes (polyhedral bodies) of Thiobacillus neapolitanus*. *J. Bacteriol.*, **116**: 1405-1411.
- , 1974. *Inclusion bodies of prokariotes*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **28**: 167-187.
- STEWART W. D. P. & G. A. CODD, 1975. *Polyhedral bodies (carboxisomes) of nitrogen-fixing blue-green algae*. *Brit. Phycol. J.*, **10**: 273-278.
- VOGLER K. G. & W. W. UMBREIT, 1941. *The necessity for direct contact in sulfur oxidation by Th. thiooxidans*. *Soil Sci.*, **51**: 331-337.
- WAKSMAN S. A. & J. S. JOFFE, 1921. *Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. Thibacillus thiooxidans, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil*. *J. Bacteriol.*, **7**: 239-256.

TAVOLA I (Ceppo Campi Flegrei)

- 1) Cellula proveniente da coltura in fase esponenziale. Il protoplasma periferico è ricco di ribosomi (R), mentre una vasta area centrale, chiara, ne è relativamente povera e presenta una fine trama fibrillare. Nella sezione è visibile un carbosoma (Cb). A ciascuna estremità della cellula si osserva un accumulo di materiale elettrodenso (frece) (x 48.000).
- 2) Porzione di una cellula. È ben visibile la struttura della parete, costituita da uno strato esterno tripartito (se) e da uno interno (si). Più internamente si osserva il plasmalemma (Pl) (GV, granulo di volutina) (x 105.000).
- 3) Due carbosomi ad elevato ingrandimento. Essi appaiono delimitati da un involucro (frece) (x 100.000).
- 4) Colorazione negativa con PTA: le cellule del ceppo sono provviste di un lungo flagello polare (x 35.000).
- 5) Cellula proveniente da coltura in avanzata fase stazionaria. Le sfavorevoli condizioni inibiscono la divisione cellulare, causando la comparsa di cellule assai più lunghe della norma. Si noti la presenza di un elevato numero di carbosomi (x 20.000).

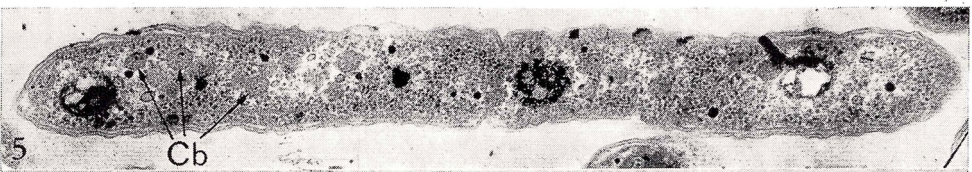
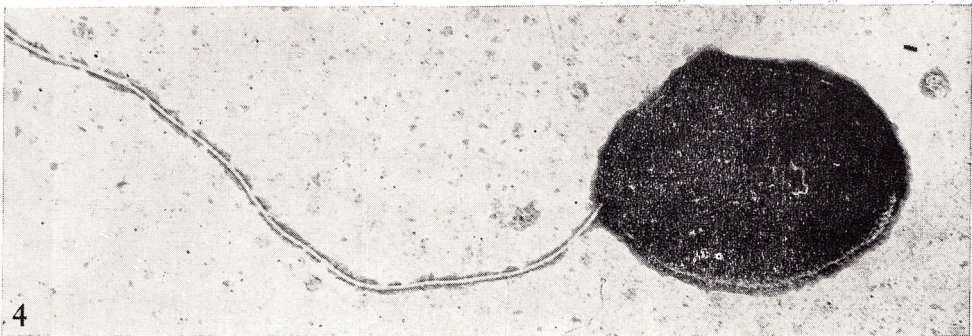
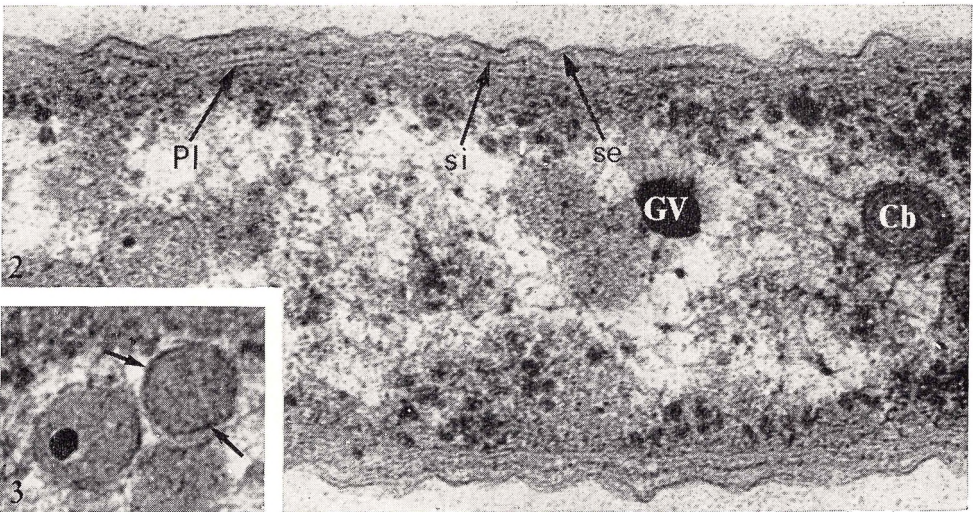
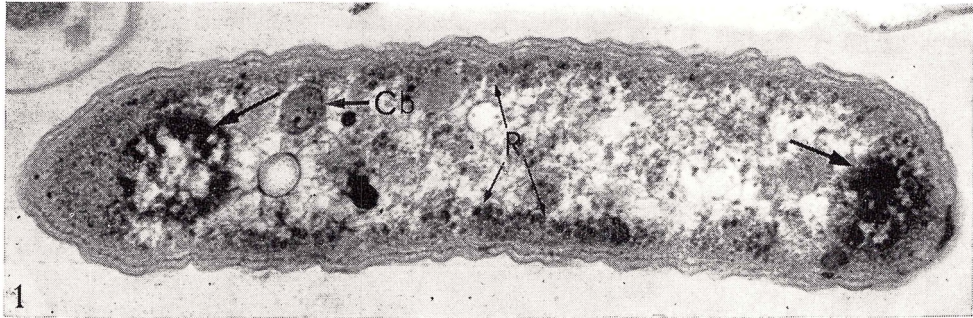


TAVOLA II (*Thiobacillus thiooxidans* Waksman & Joffe)

- 6) Colorazione negativa. Il flagello si è spezzato dando origine a due lunghi frammenti. La freccia indica il punto d'attacco alla cellula, in corrispondenza del quale si nota una prima interruzione. Nella cellula sono visibili alcuni carbosomi (Cb) ed un corpo denso (freccia) (x 40.000).
- 7) Particolare a forte ingrandimento della parete cellulare. Sono ben distinguibili i due strati, uno esterno (se) ed uno interno (si) (x 90.000).
- 8) Cellula contenente un corpo lamellare (CL), costituito da 10 dense bande sovrapposte. Sono anche visibili alcuni carbosomi ed un granulo di volutina (GV) (x 54.000).
- 9) Cellula proveniente da coltura in fase esponenziale. Il materiale nucleare è ampiamente diffuso sotto forma di fibrille di vario spessore. I ribosomi si trovano raccolti alla periferia, in prossimità della parete. Si noti l'assenza di carbosomi (x 40.000).

