

**Prime osservazioni sulla fisiologia di un ceppo di  
*Thiobacillus thiooxidans* di ambienti solfatarici. (\*\*)**

Nello studio degli ambienti termali acidi, dove è presente una particolarissima flora algale (DE LUCA e TADDEI, 1970 e 1972), molto importante è il meccanismo mediante il quale il pH si abbassa permettendo appunto la vita a quelle alghe.

Detti ambienti termali acidi sono piuttosto ristretti e limitati alle prossimità di fumarole, dalle quali fuoriescono vapori caldi di H<sub>2</sub>O misti a vapori di H<sub>2</sub>S.

Il pH delle zone acide è dovuto alla presenza di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MOLINA e BANWELL, 1970); l'acido deriva, almeno in parte, dalla ossidazione dell'H<sub>2</sub>S ad opera di microorganismi.

Dalla letteratura risulta che numerose specie del genere *Thiobacillus* sono capaci di ossidare substrati solforati; ma fra questi solo *Thiobacillus thiooxidans* Waksman & Joffe, isolato da ambienti non solfatarici, parrebbe poter operare l'ossidazione di cui sopra; essa, infatti, è l'unica specie finora riportata capace di ossidare l'H<sub>2</sub>S fino ad H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, abbassando il pH a valori inferiori ad 1 (PARKER e PRISK, 1953).

Scopo del presente lavoro è stato quello di isolare tiobatteri chemiosintetici da fumarole calde dei Campi Flegrei ed effettuare prove preliminari di raffronto col ceppo tipo di *Thiobacillus thiooxidans* isolato da WAKSMAN e JOFFE.

---

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

(\*\*) Lavoro eseguito con un contributo, per ricerche ecologiche, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato Biologia e Medicina.

MATERIALI E METODI

a) *Isolamento del batterio dei Campi Flegrei (Napoli, Italia).*

Materiale proveniente da una fumarola dei Campi Flegrei (pH=1,8; T=38°C), frammisto a sali di zolfo e ad abbondantissime alghe, fu posto in cilindri contenenti terreno di VOGLER e UMBREIT (1941) privo di S, in ambiente termostato a 38°C; nei cilindri era fatta gorgogliare una miscela di aria ed H<sub>2</sub>S (5.000/1; v/v) al buio.

La coltura fu più volte trapiantata fino a portare all'eliminazione di alghe e funghi. Dopo 5 passaggi, furono isolate colture monobatteriche su piastra contenente il terreno di VOGLER e UMBREIT solidificato con agar; lo zolfo era sostituito con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (5g/l).

b) *Attività dei ceppi a varie temperature.*

Per queste prove sono stati utilizzati un ceppo di *Thiobacillus* isolato da noi ed il ceppo di *Thiobacillus thiooxidans* isolato da WAKSMAN e JOFFE, fornito da *The American Type Culture Collection* (n° 19377).

Ambedue i ceppi sono stati coltivati, in ambiente termostato a varie temperature (25°, 30°, 35°, 40°, 45°C), in beutine contenenti terreno di coltura di VOGLER e UMBREIT, poste in agitazione su piano oscillante.

I batteri venivano adattati alle varie temperature per 10 giorni prima di ogni prova; in ogni esperimento il pH del mezzo fu inizialmente portato intorno a 2,5; in ogni beutina, per tutti gli esperimenti di ambedue i ceppi, furono posti batteri in concentrazione di 10.000.000/ml, misurati alla camera di THOMA-ZEISS.

L'attività dei batteri veniva dosata misurando l'abbassamento del pH, dovuto all'incremento di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> accumulato dalla chemiosintesi batterica. A tale scopo è stato usato un pHmetro *Beckman Expandomatic*.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In seguito a selezione su H<sub>2</sub>S ed a crescita su piastre contenenti Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, abbiamo isolato varie colonie monobatteriche apparentemente identiche. Osservate al microscopio ottico, queste colonie apparivano costituite da batteri identici al *Thiobacillus thiooxidans* isolato da WAKMAN e JOFFE (1921).

Per descrivere quindi questo batterio vanno bene le parole di WAKSMAN e JOFFE: « bastoncini brevi, con le estremità arrotondate, normalmente singoli, ma alcune volte anche uniti a coppie e raramente a triplette. La maggior parte misurano meno di 1 micron in lunghezza per 0,5 micron di diametro. Mai osservata la formazione di spore ».

Riguardo alla motilità delle cellule, nulla possiamo dire sia perché non abbiamo potuto osservare al microscopio ottico strutture così fini, quali i flagelli, sia perché non possiamo affermare con certezza che la motilità osservata non dipenda esclusivamente da moti browniani.

Ci ripromettiamo, comunque, di studiare tale batterio al microscopio elettronico onde evidenziare eventuali flagelli.

Per quanto riguarda le attività biologiche dei due ceppi, bisogna riferirsi alla Fig. 1.

Risulta evidente che l'attività dei due ceppi è praticamente identica a tutte le temperature impiegate; per entrambi i ceppi, inoltre, non esistono sostanziali differenze di attività alle varie temperature.

Molto marcate risultano invece le differenze tra i tempi di latenza dei due ceppi. Il ceppo tipo di *Thiobacillus thiooxidans*, infatti, presenta un tempo di latenza sensibilmente maggiore alle alte temperature. Il ceppo dei Campi Flegrei, viceversa, presenta un tempo di latenza decisamente maggiore alle basse temperature. Tutto questo nonostante che i due ceppi fossero adattati per 10 giorni a ciascuna temperatura, prima di ogni esperimento.

Alla temperatura di 30°C il comportamento dei due ceppi (crescita, attività, tempo di latenza) sembra essere sostanzialmente identico.

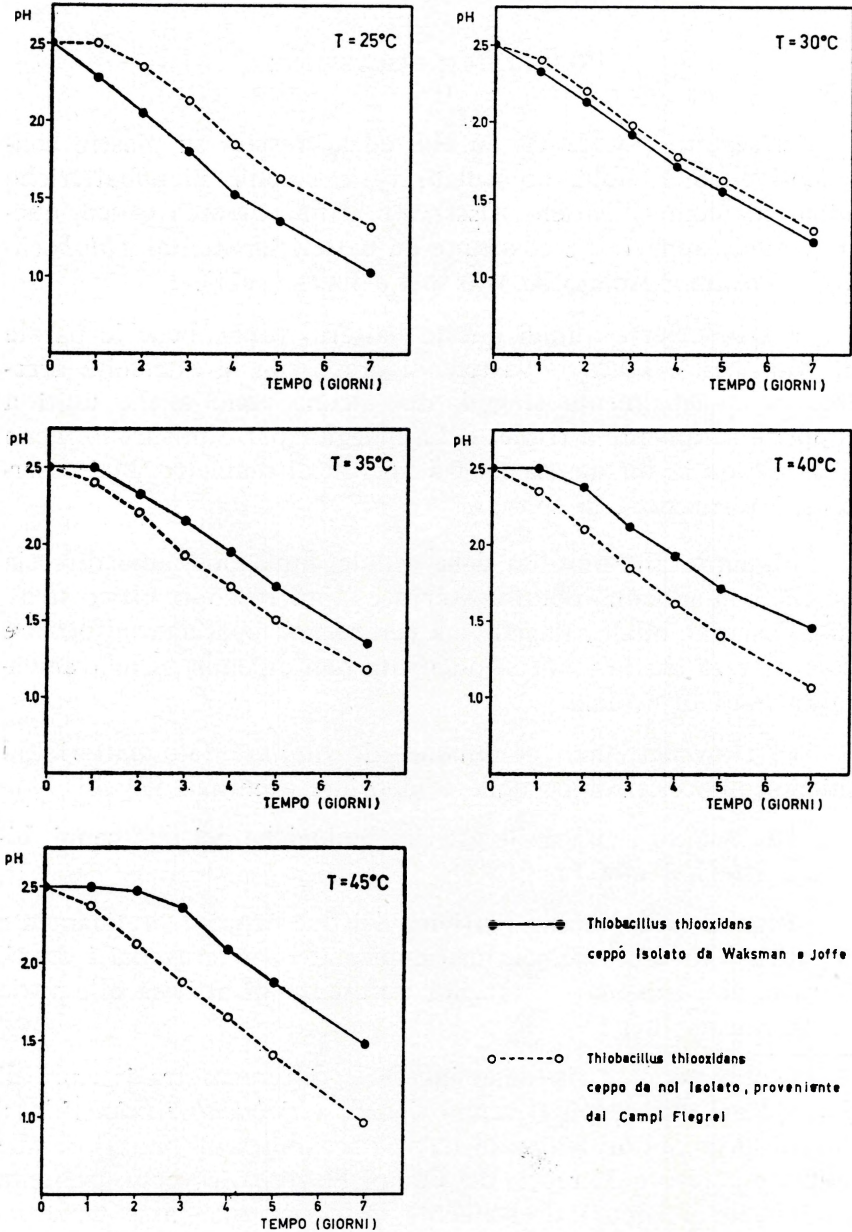


Fig. 1. Variazioni del pH in dipendenza della attività solfoossidante (produzione di  $H_2SO_4$  a partire da S) in due ceppi di *Thiobacillus thiooxidans*, coltivati a differenti temperature: il ceppo tipo della specie isolato da WAKSMAN e JOFFE ed il ceppo da noi isolato presso una fumarola dei Campi Flegrei.

Si notino soprattutto le differenze esistenti tra i due ceppi, alle diverse temperature, relativamente alla durata del periodo di latenza.

### CONCLUSIONI

Il batterio isolato ai Campi Flegrei, responsabile dell'instaurarsi di ambienti popolati da alghe acidofile termali, è simile morfologicamente al *Th. thiooxidans* Waksman & Joffe; ne differisce per alcune caratteristiche fisiologiche.

Innanzitutto il ceppo dei Campi Flegrei cresce su mezzo solidificato con agar, mentre il *Th. thiooxidans* non ne è capace (WAKSMAN e JOFFE, 1921).

Molto importante è il risultato dell'attività dei ceppi alle varie temperature.

Il ceppo dei Campi Flegrei appare più termofilo di quello di WAKSMAN e JOFFE, nel senso che il tempo di latenza del ceppo dei Campi Flegrei è maggiore alle basse temperature (annullandosi a  $T = 45^{\circ}\text{C}$ ), mentre nel ceppo di WAKSMAN e JOFFE è maggiore alle alte temperature (annullandosi a  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ).

Il nostro ceppo cresce utilizzando  $\text{H}_2\text{S}$  come fonte energetica. WAKSMAN e JOFFE (1921) dicono che il loro ceppo non si sviluppa con questo composto solforato, ma PARKER e PRISK (1953) e noi abbiamo verificato che questo dato non è esatto: probabilmente WAKSMAN e JOFFE hanno usato quantità di  $\text{H}_2\text{S}$  eccessive e letali per il batterio.

In questi paralleli abbiamo tenuto conto solo dei dati relativi al ceppo isolato da WAKSMAN e JOFFE, che costituisce *tipo vivente* della specie.

Ci ripromettiamo di effettuare studi fisiologici ed ultrastrutturali, per poter verificare se il ceppo da noi isolato differisce da *Thiobacillus thiooxidans* al punto da doverlo attribuire ad una nuova specie o se deve essere ritenuto una varietà termofila di *Th. thiooxidans*.

Nel frattempo noi lo indicheremo provvisoriamente col nome di *Thiobacillus thiooxidans* ceppo *Campi Flegrei*.

RIASSUNTO

Gli Autori hanno isolato e studiato in coltura un ceppo di *Thiobacillus* degli ambienti termali ed acidi dei Campi Flegrei (Italia).

Tale ceppo, confrontato con il tipo della specie, presenta un differente grado di termofilia, almeno per quanto concerne la durata della fase di latenza.

Provvisoriamente gli Autori gli hanno attribuito il nome di *Thiobacillus thiooxidans* ceppo *Campi Flegrei*.

SUMMARY

The Authors isolated and studied in culture a strain of *Thiobacillus* of the thermal and acid soils of Campi Flegrei (Italy).

When compared with the type of the species, this strain presents a different degree of thermophily, at least with regard to the length of the lag phase.

It provisionally may be named *Th. thiooxidans* strain *Campi Flegrei*.

BIBLIOGRAFIA

- COOK T.M., 1964. *Growth of Thiobacillus thiooxidans in shaken culture*. Journ. Bact., **88**: 620-623.
- DE LUCA P., R. TADDEI, 1970. *Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): Cyanidium caldarium?*. Delpinoa, **10-11**: 79-89.
- DE LUCA P., R. TADDEI, 1972. *Crescita comparata di due forme di «Cyanidium caldarium» dei Campi Flegrei (Napoli) in presenza di diverse fonti di azoto*. Delpinoa, **12-13**: 3-8.
- LIPMAN J.G., S.A. WAKSMAN, J.S. JOFFE, 1921. *The oxidation of sulfur by soil microorganisms*. Soil Sci., **12**: 475-489.
- MOLINA R., C.J. BANWELL, 1970. *Chemical studies in Mexican geothermal fields*. Commision Federal de Electricidad, Mexico D.F.
- PARKER C.D., J. PRISK, 1953. *The oxidation of inorganic compounds of sulphur by various sulphur bacteria*. J. Gen. Microbiol., **8**: 344-364.
- SIVAJI R., L.R. BERGER, 1971. *The requirement of low pH for growth of Th. thiooxidans*. Arch. Mikrobiol., **79**: 338-344.
- STARKEY R.L., 1934. *Isolation of some bacteria which oxidize thiosulphate*. Soil Sci., **39**: 197-215.
- STARKEY R.L., 1935. *Products of the oxidation of thiosulphate by bacteria in mineral media*. J. Gen. Physiol., **18**: 325-349.
- STARKEY R.L., 1950. *Relations of microorganisms to transformations of sulfur in soils*. Soil Sci., **70**: 55-65.
- STARKEY R.L., G.E. JONES, L.R. FREDERICK, 1956. *Effects of medium agitation and wetting agents on oxidation of sulphur by Th. thiooxidans*. J. Gen. Microbiol., **15**: 329-334.
- VOGLER K.G., W.W. UMBREIT, 1941. *The necessity for direct contact in sulfur oxidation by Th. thiooxidans*. Soil Sci., **51**: 331-337.
- VISHNIAC W., M. SANTER, 1957. *The Thiobacilli*. Bact. Rev., **21**: 195-213.
- WAKSMAN S.A., J.S. JOFFE, 1921. *Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. Thiobacillus thiooxidans a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil*. Journ. Bact., **7**: 239-256.