

Laboratorio di Terapia Sperimentale - Reparto Ricerche
Dott. Prof. A. Bruschetti

Contributo alla conoscenza della composizione del protoplasma batterico (*)

F. Savoia

Nel quadro delle ricerche che già da tempo si conducono in questo Laboratorio é presa in considerazione la struttura del protoplasma batterico sia di ceppi normali che resi resistenti a diversi agenti, sia in riferimento ai diversi terreni di cultura e al tempo di sviluppo.

In questi ultimi tempi lo studio e la ricerca di aminoacidi liberi o combinati, di metaboliti e di altre sostanze di origine batterica é stato potenziato e facilitato sfruttando in questa ricerca le diverse tecniche di cromatografia su carta.

Gli ottimi risultati, oltre a renderli bene accettati, hanno grandemente contribuito allo sviluppo dell'uso di questi metodi.

Cosí POLSON, KELLNER ed altri hanno messo in evidenza aminoacidi presenti negli idrolizzati di *E. coli* (1 a 5,41,49), di *S. aureus* (78) normali e penicillino resistenti (24). BLASS e collaboratori hanno effettuato studi sul vibrione del colera (10,11); WORK sul *C. diphtheriae* (12 a 15). Sono stati pure investigati: *S. faecalis* (16,17), *H. paraptussis* (18, 23), *E. typhi* e *S. paratyphi* (19), *B. polymixa* (31), *Lactobacillus casei* (17,45), *Brucella* (22), *Bordetella* (23), *Salmonella* (48).

WOIWOD, ASSELINEAU e diversi altri autori hanno applicato

(*) Comunicación 10-11, a las V Jornadas Bioquímicas Latinas. Barcelona, mayo 1959.

queste tecniche per lo studio di filtrati di culture microbiche (6,62), di aminoacidi (63 a 65), di acidi organici (5,59), di zuccheri (61) e lipopolisaccaridi (48) di origine batterica; come pure di tessuti e cromosomi di *Drosophila virilis* (29) e di *Paramecium* (20,21).

Sono state effettuate ricerche in questo senso sui batteri della dissenteria (47) e del tetano (60) e si è cercata una differenziazione fra streptococchi (8) e lattobacilli (43).

Oggetto di studi sono stati: *S. haemoliticus* (25) e *Hypomyces* (52) in riferimento ai diversi terreni di cultura: microorganismi anaerobi (30,58,59,60); *Aspergillus oryzae* (44, 66); *Serratia marcescens* (50); *Streptomyces fradiae* (51); *Candida albicans* (53); *Clostridium botulinum* (54); *B. subtilis* (55) e *gracilis* (61).

Con identiche tecniche sono studiati vari tipi di penicillum (40,44,46), si sono ricercate le sostanze fluorescenti di *Eremothecium ashbyii* (42); la costituzione antigenica di *Salmonelle* (56) e di *Malleomyces pseudomallei* (57) e le tossine difterica (26,27) e stafilococcica (28).

Interessanti studi sono stati effettuati sul metabolismo azotato dei batteri (32,35) e del triptofano per opera del *B. Koch* (33), come pure sugli aminoacidi liberi (34,37) e sull'azione di vari antibiotici e chemioterapici (36,38,39) sempre sul bacillo tubercolare.

Nel presente lavoro sono stati presi in considerazione ed esaminati con tecniche cromatografiche gli idrolizzati di differenti ceppi della nostra collezione. Di ogni ceppo sono stati controllati diversi stipiti.

Le culture sono state ottenute da semine su agar e su agar ascite; i tempi di incuabazione vanno da 18 a 72 ore per ogni signolo ceppo.

Al termine dell'incubazione ogni singola cultura (4-5 tubi sono sufficienti) è stata ripresa con acqua distillata. La sospensione è centrifugata e il sedimento lavato, nel più breve tempo possibile per due volte con acqua distillata, centrifugando ogni volta. L'ultimo lavaggio deve dare, previa idrolisi acida, risultato negativo alla cromatografia (reazione nulla alla ninidrina). Il residuo, dopo l'ultimo lavaggio, è idrolizzato per 18 ore a ricadere con circa 10 cc di HCL 8N. L'idrolisi è fatta nello stesso tubetto da centrifuga ($\varnothing$ mm 30; h mm 100).

L'idrolizzato è quindi concentrato in piccolo cristallizzatore tarato fin quasi a secchezza. Si riprende più volte con acqua d. riconcentrando ogni volta sino ad eliminazione dell'acido. L'ultima volta il liquido viene filtrato. Il residuo è ripreso proporzionalmente con una piccola quantità di miscela propanolo-

acqua (1:9 v/v) e con questo liquido si procede all'indagine cromatografica.

I metodi usati sono quello bidimensionale e radiale modificato (67).

Ottimo risultato ha dato il seguente metodo: sviluppo monodimensionale ascendente con deposizione a banda lunga e continua su tutta la linea di partenza; rivelazione delle frazioni solo su due piccole porzioni di carta ai due lati opposti del foglio; eluizione separata delle diverse frazioni ottenute previo taglio della carta in strisce servendosi come guida delle due porzioni laterali visibilizzate; cromatografia bidimensionale o radiale dei singoli eluati.

Test ottenuti con campioni noti servono di confronto.

Tecnica e materiali impiegati sono quelli usuali per lo studio degli aminoacidi:

carta W. 1 e 2; S.S. 2043; minidrina (in soluzione acetonica acida leggermente per ac. acetico) come reattivo generale, più altri reattivi specifici; temperatura di sviluppo $+20^{\circ}$ ($\pm 1^{\circ}$); fasi mobili:

butanolo normale-ac. acetico-acqua (4:1:5 v/v); fenolo-acqua (7,5:2,5 p/v) con 1 % di ammoniaca; butanolo terziario-metiletichetone-acqua (4:4:2 v/v); butanolo terz.-metanolo-acqua (4:5:1 v/v) (68);

isobutanolo-piridina-acqua-ac. acetico (33:33:33:1 v/v).

Da numerose esperienze condotte con le modalità descritte, negli idrolizzati in esame sono stati separati e identificati i seguenti aminoacidi:

Bacterium prodigiosum: ac. glutammico, alanina, glicina, leucina, serina, arginina, ac. aspartico, metionina, valina, istidina, prolina, fenilalanina, tirosina, lisina, treonina.

Gaffkya tetragena: ac. glutammico, alanina, leucina, glicina, serina, prolina, ac. aspartico, metionina, valina, arginina, istidina, fenilalanina, tirosina, treonina, lisina. Accanto alla macchia della tirosina compare una macchia assai leggera non identificata; lo stesso sotto alla alanina, ma di colore diverso e più intenso.

Neisseria gonorrhoeae: alanina, ac. glutammico, glicina, serina, ac. aspartico, prolina, metionina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, istidina, arginina. Queste due ultime hanno sempre i contorni sfumati e la lisina si confonde facilmente e non sempre risulta chiaramente individuabile. Leggera la macchia della treonina.

Proteus vulgaris: ac. glutammico, alanina, prolina, leucina, ac. aspartico, glicina, metionina, valina, serina, arginina, istidina (non sempre ben separata), fenilalanina, tirosina. La lisina

e la treonina sono le più difficili da identificare perché evidentemente presenti in tracce minime.

Pasteurella suisepitica: alanina, ac.glutammico, arginina, glicina, serina, ac.aspartico, istidina, lisina, prolina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, tirosina, treonina. Anche qui compaiono due macchie non identificate.

Shigella dysenteriae: ac. glutammico, alanina, prolina, leucina, glicina, serina, arginina, ac.aspartico, istidina, metionina, valina, tirosina, fenilalanina, lisina, treonina. Queste due ultime macchie risultano molto deboli, la prima inoltre confusa.

Sarcina alba: ac.glutammico, alanina, glicina, serina, arginina, istidina, leucina, metionina, valina, prolina, fenilalanina, tirosina, lisina, treonina. L'ac.aspartico è alonato. Macchia non identificata di colore olivastro sottoposta a quella dell'alanina.

Bacterium aerogenes: alanina, glutammico ac.glicina, prolina, serina, arginina, ac.aspartico, istidina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, tirosina, lisina, treonina (difficili queste due da identificare).

Leggera traccia di macchia olivastro, non identificata, accanto a quella dell'alanina.

Streptococcus viridans: ac.glutammico, alanina, glicina, leucina, serina, arginina, istidina, ac.aspartico, metionina, valina, fenilalanina, prolina, tirosina, treonina, lisina.

Pasteurella bobiseptica: alanina (leggera macchia olivastro al di sotto di questa), ac.glutammico, arginina, leucina, glicina, serina, istidina, ac.aspartico, metionina, valina, prolina, fenilalanina, tirosina, lisina, treonina.

Pasteurella cuniculicida: ac.glutammico, alanina (inferiormente questa macchia mostra un alone rosa livido), arginina, glicina, serina, leucina, istidina, ac.aspartico, metionina, valina, prolina, fenilalanina, tirosina, lisina, treonina.

Neisseria catarrhalis: alanina, ac.glutammico, glicina, serina, prolina, metionina, valina, leucina, fenilalanina, ac.aspartico, tirosina, istidina, arginina, lisina, treonina. Lisina e treonina, come pure la fenilalanina sono presenti in piccole quantità e non sempre chiaramente identificabili.

Salmonella enteritidis: ac.glutammico, alanina, leucina, arginina, glicina, ac.aspartico, prolina, serina, istidina, metionina, valina, lisina, fenilalanina, tirosina, treonina. Macchia molto leggera di colore diverso (livido) sotto a quella dell'alanina.

Come nota generale si può dire che in genere in tutti i cromatogrammi si ottengono nella zona degli acidi aspartico-glutammico delle macchie o aloni, cosa più volte riscontrata da diversi autori (69,70) che non corrispondono ad aminoacidi noti.

Pure non identificata rimane una macchia sotto a quella dell'alanina, macchia alonata che col reattivo alla ninidrina talvolta compare con colorazione nettamente differente dalle altre; in certi cromatogrammi appare una leggerissima sfumatura colorata accanto alla tirosina, non chiara, forse trascurabile.

Il triptofano non compare in quanto distrutto dall'idrolisi acida. La macchia della lisina si confonde facilmente con quelle accanto dalla caratteristica forma allungata (arginina). La glicina e la serina in tutti gli esperimenti non si sono mai ottenute nettamente separate, tuttavia risultano quasi sempre distinguibili una dall'altra. La valina e la metionina risultano sempre sovrapposte.

L'ordine con il quale gli aminoacidi identificati sono sopra elencati sta ad indicare molto approssimativamente, in ordine decrescente, la quantità relativa di aminoacido presente.

Concludendo negli idrolizzati dei seguenti ceppi presi in esame: *Bacterium prodigiosum* e *aerogenes*, *Gaffkya tetragena*, *Neisseria gonorrhoeae* e *catarrhalis*, *Proteus vulgaris*, *Pasteurella suisepctica*, *bobiseptica* e *cuniculicida*, *Shigella dysenteriae*, *Sarcina alba*, *Streptococcus viridans*, e *Salmonella enteritidis* sono stati trovati, in tutti, i seguenti aminoacidi: ac.aspartico, ac. glutammico, alanina, glicina, serina, treonina, lisina, arginina, istidina, tirosina, prolina, valina, metionina, fenilalanina, leucina. Si può asserire quindi che non esistono differenze di ordine qualitativo per quanto riguarda la loro composizione in aminoacidi principali. Dal punto di vista quantitativo sarà interessante in seguito sviluppare e approfondire la ricerca in questo senso.

Variando il tempo di crescita e il terreno di cultura, tale composizione rimane costante. Per i diversi stipiti dello stesso ceppo appare evidente, benché con approssimazione da un confronto a vista dei cromatogrammi, la somiglianza nell'ordine quantitativo.

Riassunto

Sono effettuate ricerche sulla composizione del protoplasma batterico. Mediante analisi cromatografica sono separati e identificati gli aminoacidi presenti negli idrolizzati dei seguenti ceppi: *Bacterium prodigiosum* e *aerogenes*, *Gaffkya tetragena*, *Neisseria gonorrhoeae* e *catarrhalis*, *Proteus vulgaris*, *Pasteurella suisepctica*, *bobiseptica* e *cuniculicida*, *Shigella dysenteriae*, *Sarcina alba*, *Streptococcus viridans*, *Salmonella enteritidis*. E' risultata uguaglianza di composizione per i diversi stipiti presi in considerazione.

Summary

Contribution to the knowledge of the bacteric protoplasm composition

Many research have been performed on bacterial protoplasm composition. By means of chromatographic analysis, the aminoacids present have been separate and identified in the following hydrolisated strains: *Bacterium prodigiosus* e *aerogenes*, *Gaffkya tetragena*, *Neisseria gonorrhoeae* e *catarrhalis*, *Proteus vulgaris*, *Pasteurella suisepitica*, *bobiseptica* e *cuniculicida*, *Shigella dysenteriae*, *Sarcina alba*, *Streptococcus viridans*, *Salmonella enteritidis*. Equality of composition always resulted for the different strains of the germs taken into consideration.

Bibliografia

- (1) A. POLSON : *Nature.*, **161**, 351, 1948.
- (2) A. POLSON : *Bioch. Biophys. Acta.*, **2**, 575, 1948 e **3**, 205, 1949.
- (3) J. KELLNER, A. MARTIN : *Naturwiss.*, **41**, 164, 1954.
- (4) A. POLSON, R. WYCKOFF : *Science.*, **108**, 501, 1948.
- (5) W. ACKERMANN, H. KIRBY : *J. Biol. Chem.*, **175**, 483, 1948.
- (6) A. J. WOIWOD : *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 312, 1949.
- (7) F. SAVOIA : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **34**, 521, 1958.
- (8) F. SAVOIA : *Giorn. Batter. Immunol.*, **49**, 411, 1956.
- (9) E. TIBALDI, G. TOZZOLA : *Annali d'Igiene*, 449, 1952.
- (10) J. BLASS, O. LECOMPTE, M. MACHEBOEUF : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1552, 1951 e **29**, 903, 1947.
- (11) SAMARINA e coll. : *Biokhimiya.*, **15**, 287, 1950.
- (12) E. WORK : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 138, 1949.
- (13) E. WORK : *Nature.*, **165**, 74, 1950.
- (14) E. WORK : *Biochem. Biophys. Acta.*, **3**, 400, 1949.
- (15) YU V. GALAEV : *Biokhimiya.*, **20**, 673, 1955 e **23**, 341, 1958.
- (16) R. DÍAZ-CADAVECO, G. De la FUENTE-SÁNCHEZ : *R. esp. Fisiol.*, **11**, 49, 1955.
- (17) MIYOSHI IKAWA, E. SNELL : *Biochim. Biophys. Acta.*, **19**, 576, 1956.
- (18) E. TIBALDI : *Nuovi Ann. d'Igiene Microbiol.*, **4**, 128, 1953.
- (19) F. SAVOIA : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **32**, 226, 228, 1956.
- (20) J. WARREN LEE : *Trans. Am. Microscop. Soc.*, **75**, 228, 1956.
- (21) J. WARREN LEE, A. RENE : *Proc. Louisiana Acad. Sc.*, **18**, 13, 1955.
- (22) F. SAVOIA : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **33**, 554, 1957.
- (23) E. ROWATT : *J. Gen. Microbiol.*, **13**, 552, 1955.
- (24) F. CUGURRA, F. SAVOIA : *Giorn. Microbiol.*, **5**, 70, 1958.
- (25) F. SAVOIA : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **34**, 864, 1958.
- (26) A. J. WOIWOD, F. LINGGOOD : *Nature.*, **163**, 216, 1949.

- (27) A. J. WOIWOD : *Brit. J. Exp. Pathol.*, **29**, 283, 1948 e **30**, 93, 1949.
- (28) D'ACRA SIMONETTI : *Nuovi Ann. d'Igiene Microbiol.*, **5**, 17, 1954.
- (29) J. BLENNEL, H. KIRBY : *Anal. Chem.*, **22**, 48, 1950.
- (30) G. TOZZOLA : *Nuovi Ann. d'Igiene Microbiol.*, **5**, 94, 1954.
- (31) A. JONES : *Bioch. J.*, **43**, 26, 1948.
- (32) H. PROOM, A. WOIWOD : *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 319, 1949.
- (33) A. BENASSI, B. PERISSINOTTO : *Boll. Ist. Sieroter. Mil.*, **31**, 90, 1952.
- (34) G. DRAGONI : *Aminoacidosi.*, **6**, 10, 1956.
- (35) G. PAULETTA, A. DEFRANCESCHI : *Biochim. Biophys. Acta.*, **9**, 271, 1952.
- (36) F. CUGURRA, G. COSTA, F. SAVOIA : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **33**, 552, 1957.
- (37) G. DRAGONI : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **31**, 962, 1955.
- (38) R. SEIBERT, P. KENT : *Brit. J. Exp. Pathol.*, **31**, 689, 1951 e **31**, 691, 1951.
- (39) W. H. STEIN, S. MOORE : *Cold Spring Harbor Symp. Quat. Biol.*, **14**, 179, 1950.
- (40) C. FROMAGEOT, M. JUTISZ, P. TESSIER : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 689, 1949.
- (41) G. AGREN : *Acta Chem. Scand.*, **10**, 152, 1956.
- (42) TORU MASUDA : *Pharm. Bull. (Japan)*, **4**, 71, 74, 1956.
- (43) A. MATTICK e coll. : *J. Appl. Bacteriol.*, **19**, 310, 1956.
- (44) J. DATTA e coll. : *Am. J. Biochem. Exp. Med.*, **17**, 35, 1957.
- (45) J. McANALLY, M. SPECK : *J. Bacteriol.*, **73**, 676, 1957.
- (46) P. SIMONART e coll. : *Zentr. Bakter. Parasitenk.*, **110**, 194, 1957.
- (47) G. A. GORCHAKOVA : *Chem. Abs.*, **52**, 12007, 1958.
- (48) A. NOWOTNY, O. LUDERITZ, O. WESTPHAL : *Biochem. Z.*, **330**, 47, 1958.
- (49) F. ROSSI, G. PERONA : *Giorn. Batt. Immunol.*, **50**, 454, 1957.
- (50) W. PAYNE : *J. Bacteriol.*, **75**, 240, 1958.
- (51) A. ROMANO, W. NICKERSON : *J. Bacteriol.*, **75**, 161, 1958.
- (52) J. TOUZÉ SOULET, C. MONTANT : *C. R. Soc. Biol.*, **152**, 874, 1958.
- (53) J. BIGUET, R. OSTEUX, VAN KY TRAU : *C. R. Soc. Biol.*, **152**, 512, 1958.
- (54) L. BOUISSET, J. BREUILLAUD, V. GRIZOU : *C. R. Soc. Biol.*, **151**, 176, 1957.
- (55) S. NANI, G. GIOLITTI : *Boll. Ist. Sieroter. Mil.*, **36**, 520, 1957.
- (56) G. BO, G. NAVA : *Boll. Ist. Sieroter. Mil.*, **36**, 556, 1957.
- (57) L. CHAMBUO, A. STAUB, M. BOURDET : *Ann. Inst. Pasteur.*, **93**, 376, 1957.
- (58) Z. STRAPATSAKI COCOVINI : *Ann. Inst. Pasteur.*, **93**, 647, 1957.
- (59) M. MOUREAU : *Ann. Inst. Pasteur.*, **93**, 656, 1957.
- (60) G. VINET, V. FREDETTE : *Ann. Inst. Pasteur.*, **94**, 530, 1958.
- (61) D. JERCHER, P. FLESCH, E. BAUER : *Ann. d. Chem.*, **601**, 40, 1956.
- (62) A. J. WOIWOD, H. PROOM : *J. Gen. Microbiol.*, **4**, 501, 1950.
- (63) J. ASSELINEAU e coll. : *Bioch. Biophys. Acta.*, **5**, 197, 1950.

- (64) E. WORK : *Bioch. Biophys. Acta.*, **5**, 204, 1950.
- (65) E. WORK : *Biochem. J.*, **49**, 17, 1951.
- (66) AYAKO MATSUSHITA, AKIRA YAMADA : *J. Home Econ.*, **7**, 17, 1956.
- (67) F. SAVOIA : *Il Farmaco* (ed. pr.), **13**, 612, 1958.
- (68) R. A. BOISSONNAS : *Helv. Chim. Acta.*, **33**, 1972, 1950.
- (69) C. DENT : *Biochem. J.*, **41**, 102, 1947.
- (70) W. ACKERMANN, H. KIRBY : *J. Biol. Chem.*, **175**, 483, 1948.