
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SANDRA CARINI, ENRICA GALLI

Riduzione del colesterolo in vitro per opera di *Escherichia coli* e *Clostridium sporogenes*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.6, p. 972-979.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_6_972_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Microbiologia. — *Riduzione del colesterolo in vitro per opera di Escherichia coli e Clostridium sporogenes* (*). Nota di SANDRA CARINI ed ENRICA GALLI, presentata (**) dal Corrisp. C. ARNAUDI.

Ormai da decenni alcuni Autori, seguendo strade diverse, hanno dato la prova che la riduzione del colesterolo a coprosterolo, nota quale trasformazione biochimica che avviene normalmente nell'intestino dei mammiferi, è da attribuirsi all'azione della microflora intestinale [1-2-3-4-5-6].

Negli ultimi anni sono state ottenute in colture *in vitro* riduzioni quantitativamente cospicue di coprosterolo in un brodo a base di cervello [7-8] ed in un terreno semi-sintetico [9], senza per altro riuscire ad isolare i ceppi responsabili di detta trasformazione.

Nel corso di queste indagini era risultato inoltre che diete diverse, a prevalenti componenti proteici o carboidrati, potevano modificare il rapporto fra colesterolo e coprosterolo fecali [10-6], rapporto che veniva pure alterato se a dette diete veniva aggiunto colesterolo o cervello [12-13]. Si avanzò l'ipotesi che in queste mutate condizioni sperimentali si modificasse la composizione della flora intestinale.

Sempre nel tentativo di dimostrare quale importanza si possa attribuire all'azione dei batteri nell'idrogenazione del colesterolo, Rosenheim e Webster [2] e successivamente Wainfan e coll. [11] somministrarono a ratti sulfamidici (succinilsulfatiazolo) e antibiotici (streptomycin) con la dieta; i primi ottennero inibizione nella formazione di coprosterolo, ed il secondo osservò che il colesterolo durante il trattamento con antibiotici non viene normalmente degradato; quest'ultimo Autore non dosò il coprosterolo. In seguito Coleman e Baumann [10] sempre in prove *in vivo*, constatarono un diverso potere deprimente da parte di alcuni antibiotici sull'escrezione di coprosterolo e, precisamente, fra gli antibiotici provati, la penicillina risultò la più inibente, seguita scalarmente da aureomicina, cloromicetina e streptomycin. Da qui l'ipotesi di una diversa sensibilità dei componenti della microflora intestinale riducente il colesterolo ai farmaci provati.

Si era giunti frattanto ad ottenere una miscela di batteri, provenienti da feci per successivi arricchimenti in terreno al cervello, che poteva indefinitamente, riseminata in adatte condizioni colturali, saturare il doppio legame del colesterolo con rese in coprosterolo del 50 e più %.

Nostre esperienze confermarono, in prove *in vitro*, che streptomycin solfato e tetraciclina cloridrato agiscono effettivamente sulla flora specifica

(*) Lavoro eseguito presso il Centro di Studio per le Trasformazioni Microbiche di Idrocarburi, Steroidi e derivati, del Consiglio Nazionale delle Ricerche aggregato all'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Milano.

(**) Nella seduta del 12 maggio 1962.

atta a compiere la riduzione del colesterolo a coprosterolo; pur inibendo la formazione di quest'ultimo, nelle colture non viene alterato il numero complessivo dei batteri, ma probabilmente l'equilibrio fra le più specie presenti e che collaborano a questa trasformazione [14]. Nell'organismo animale tale alterato equilibrio, in seguito a diete più antibiotici, può avere come conseguenza un aumentato tasso di colesterolo nel sangue [15], come è stato da noi ultimamente denunciato.

Risultava così che i batteri allo studio fossero sensibili *in vivo* e *in vitro* a determinate condizioni ambientali e nutritive oltre che alla presenza di antibiotici.

L'isolamento dei ceppi riducenti il colesterolo presentava notevoli difficoltà, cosicché riuscivano vani tutti i tentativi di alcuni Autori ed anche nostri per ottenere la suddetta reazione da singoli batteri isolati dalle feci o dalle colture di arricchimento sopra descritte.

Si allestirono numerose prove allo scopo di isolare i ceppi presenti in suddette colture, e quindi trovare quelli atti alla conversione del colesterolo, soli o in opportuni accoppiamenti ed anche stabilire le condizioni indispensabili alla loro crescita e alla formazione del corredo enzimatico utile a detta trasformazione; questa probabilmente coinvolge più passaggi con formazione di prodotti intermedi e perciò può richiedere l'intervento di diverse specie microbiche.

PARTE SPERIMENTALE.

Terreni colturali

- | | |
|--|---|
| 1) Brodo cervello | 1% cervello di bue liofilizzato, 1% peptone, 0,1% glucosio, 0,1% cisteina cloridrato (cc. 50 di brodo cervello per ogni coltura). |
| 2) Brodo VF (anaerobi sporigeni) | brodo di carne e fegato secondo Prevot [16]. |
| 3) Brodo VF agarizzato | secondo Prevot [16]. |
| 4) Agar desossicolato (coliformi) | <i>Desoxicholate agar</i> (Difco). |
| 5) Terreno colturale agarizzato per <i>Salmonelle</i> | secondo Wilson e Blair [17]. |
| 6) Terreno colturale agarizzato per <i>Enterococchi</i> | terreno all'esculina secondo Puntoni [18] agarizzato. |
| 7) Terreno colturale agarizzato per <i>Lattobacilli</i> | <i>Bacto Micro Assay culture agar</i> 0319-15 (Difco Lab.) |
| 8) Terreno colturale agarizzato per <i>Proteus</i> | secondo Nogady G. [19]. |
| 9) Terreno colturale alla gelatina per <i>Proteolitici</i> | <i>Bacto nutrient gelatin dehydrated</i> 0011-01 (Difco Lab.). |

I batteri anaerobi isolati dal terreno VF agarizzato vennero conservati in brodo VF ed in vaso da vuoto, i rimanenti in normale brodo nutritivo.

Estrazione e identificazione del coprosterolo delle colture. - Per separare e identificare lo sterolo saturo si è seguito il metodo di Schoenheimer, già da noi indicato in un lavoro precedente [9]; l'identificazione del coprosterolo è stata inoltre eseguita per cromatografia su strato sottile secondo Stahl [20].

Preparazione del filtrato amicrobico. - Il filtrato amicrobico è ottenuto dal liquido colturale di un brodo cervello, seminato con l'arricchimento attivo sul colesterolo e incubato per 2-3 giorni a 37°C. Detto brodo, notevolmente torbido, per la presenza di cervello, più o meno peptonizzato, e per la crescita microbica, viene filtrato su uno strato di amianto e cotone, quindi il filtrato ormai limpido è sterilizzato con una doppia filtrazione sotto vuoto su membranfilter (nn. 1-5). Controlli batteriologici hanno garantito la amicrobicità di detto filtrato.

Estratto acquoso feci. - Una sospensione di feci di ratto in acqua sterile viene centrifugata. La frazione liquida usata per la semina, che contiene un numero limitato di specie microbiche, corrisponde a circa 3 grammi di feci.

RISULTATI SPERIMENTALI.

Da tempo si era visto che per ottenere la conversione del colesterolo a coprosterolo anche nelle condizioni sperimentali ottimali erano necessarie semine massive di feci o di liquido colturale incubato; se la quantità di materiale usato per la semina veniva ridotta, non si otteneva più *in vitro* accumulo di coprosterolo. Una esperienza precedente (loc. cit.) aveva dimostrato che l'inoculo con feci poteva essere sostituito con un estratto acquoso di feci, liberato dalle sostanze insolubili; questa sospensione microbica risultò contenere relativamente pochi microrganismi per cc, per cui era legittima l'ipotesi che nelle semine per diluizioni successive o comunque in piccole quantità non venisse a mancare la flora atta alla riduzione, ma un *quid*, contenuto nelle feci o nel liquido colturale, ad azione stimolante l'accrescimento di alcuni gruppi di batteri interessati nella trasformazione.

Si allestì allora una esperienza che dimostrò come seminando il solito brodo cervello con sospensioni microbiche ottenute per diluizioni successive ed incubandole nelle adatte condizioni colturali, pur non avendo nella prima coltura un accumulo di coprosterolo, questo può essere ottenuto nelle risemine successive.

Nella Tabella I sono riportati i risultati ottenuti incubando quantità scalarmente decrescenti di semina, sia di diretta origine fecale sia da colture precedenti attive sul colesterolo. In entrambi i casi si ha un netto arresto nell'accumulo di coprosterolo quando la quantità di semina si riduce ad 1/10, 1/100, della dose normalmente usata.

TABELLA I.

Influenza della quantità di semina sulla resa in coprosterolo.

	S e m i n a	Giorni di incuba- zione	Coprosterolo in milligrammi	Coprosterolo nelle risemine		
				I	II	III
1 (*)	estratto acquoso feci	—	—			
2	estratto acquoso feci	7	89,7			
3	estratto acquoso feci	15	76,4			
4	1/5 estratto acquoso feci	7	61,1			
5	1/10 estratto acquoso feci	7	62,6			
6	1/100 estratto acquoso feci	7	—			
7	10 cc coltura mista	7	61,4	64,4	52,4	61,2
8 (**)	1 cc coltura mista	7	—	+	++	+++
9 (**)	0,1 cc coltura mista	7	—	+	++	+++
10 (**)	0,01 cc coltura mista	7	—	—	++	+++
11 (**)	0,001 cc coltura mista	7	—	—	++	+++

(*) Controllo seminato e non incubato.

(**) In queste prove non si è dosato il coprosterolo quantitativamente, ma si è dato di esso, precipitato come digitonide, una valutazione approssimata considerando +++ = resa ottima; ++ = resa scarsa; + = tracce.

Nelle prove nn. 7-8-9-10-11 di cui si sono fatte più risemine successive prelevando 10 cc di liquido colturale, che venne incubato sempre nelle medesime condizioni, si è ottenuta una resa in coprosterolo via via maggiore sino ad un ottimo alla 3^a risemina.

Tali risultati, a nostro avviso, confermano l'ipotesi che in questa trasformazione non è sufficiente la sola presenza dei batteri, ad essa preposti, che evidentemente nelle prove 8-9-10-11 erano presenti anche nella 1^a semina, ma occorre pure, probabilmente, un fattore dai batteri stessi elaborato e lasciato nel terreno colturale.

In un secondo tempo si è preparato un filtrato amicrobico delle colture in brodo cervello incubate con flora riducente il colesterolo; questo filtrato venne aggiunto nella quantità di 5 cc ciascuna alle nuove colture seminate con dosi scalarmente decrescenti, secondo il metodo delle diluizioni successive.

Dalla Tabella II risulta evidente che il liquido colturale, ove è avvenuta la trasformazione del colesterolo in coprosterolo, privato dei microbi, favorisce la flora riducente il colesterolo, cosicché si ha la riduzione anche in quelle colture ove, per la diminuita quantità di semina nel corrispondente controllo, non si ottiene più nessun accumulo di coprosterolo.

TABELLA II.

Azione del filtrato amicrobico sulla riduzione del colesterolo in vitro.

	Semina cc	Filtrato amicrobico cc	Resa in coprosterolo (*)
1	I	5	+++
2	0,1	5	+++
3	0,01	5	+++
4	0,001	5	+
5	—	5	—
6	I	—	++
7	0,1	—	+
8	0,01	—	—
9	0,001	—	—
10	—	—	—

(*) +++ = resa ottima; ++ = resa scarsa; + = tracce.

Isolamento dei batteri presenti nelle colture riducenti il colesterolo. — I batteri che intervengono nella saturazione del doppio legame degli steroli sembrano appartenere alla normale flora intestinale dei mammiferi; infatti questa trasformazione avviene normalmente nell'intestino, è influenzata da diete o farmaci, ed è ritenuta una delle vie di regolazione del tasso di colesterolo nell'organismo. Si sono perciò allestiti i terreni colturali adatti per isolare i più comuni componenti della microflora intestinale. Nelle nostre colture, ottenute da materiale fecale per successive risemine nelle condizioni già descritte, risultarono presenti ceppi appartenenti ai seguenti gruppi: anaerobi sporigeni (*Clostridium*), coliformi, Salmonelle, lattobacilli, enterococchi, Proteus, proteolitici aerobi (*B. subtilis*, *B. mesentericus*).

Nelle colture non è costante il rapporto numerico fra i diversi gruppi; difficoltoso è stato l'isolamento di alcuni di essi (per esempio i coliformi) che risultavano presenti in numero molto inferiore ad altre specie con le medesime caratteristiche colturali. Per ogni gruppo si isolarono più ceppi.

Risemina dei ceppi isolati. — I ceppi di batteri isolati vennero riseminati nel medesimo brodo cervello usato normalmente per la riduzione *in vitro* del colesterolo, singolarmente o diversamente riuniti, aggiungendo o no a dette prove il filtrato amicrobico di cui sopra si è detto. Alla fine delle numerose prove risultò che un solo accoppiamento sembra portare alla formazione di coprosterolo: quello dei clostridi + coliformi, quando al terreno colturale venga aggiunto filtrato amicrobico. Altri batteri isolati appartenenti ai gruppi di Salmonelle, enterococchi, lattobacilli, uniti ai precedenti, non migliorano la resa in coprosterolo anzi sembrano deprimerla (Tabella III, n. 6).

TABELLA III.

Riduzione del colesterolo ad opera di ceppi isolati.

	Semina	Filtrato amicrobico cc	Coprosterolo
1	clostridi <i>e—g—i—m</i> + coli	—	—
2	clostridi <i>f—h—l—n</i> + coli	—	—
3	clostridi <i>h—l—m</i> + coli + salmonella + enterococco + lattobacillo	—	—
4	come 1	5	+
5	» 2	5	+
6	» 3	5	—
7 (*)	» 1	5	+
8 (*)	» 2	5	+
9 (*)	» 3	5	tracce
10	clostridio <i>e</i> + coli	5	+

(*) Al terreno colturale fu aggiunta cistina anziché cisteina come in tutte le precedenti colture.

Nella Tabella III sono riportati i risultati di alcune prove di fermentazione del colesterolo ad opera dei ceppi isolati. I ceppi di clostridi sono denominati con lettere dell'alfabeto; dalle prove morfologiche e biochimiche

allestite per la identificazione sono risultati pressoché tutti riferibili a poche specie; in particolare il ceppo *e*, usato da solo nella prova 10, sembra potersi identificare col *Clostridium sporogenes* secondo il *Bergey's Manual* [21]; da quest'ultimo si differenzia solo nella capacità di ridurre i nitrati a nitriti.

Il ceppo denominato *coli*, isolato da piastre all'agar desossicolato (terreno colturale 4), presenta i caratteri che permettono di identificarlo con un ceppo della specie *Escherichia coli*.

I ceppi usati derivano da isolamenti in diversi terreni culturali e precisamente: le salmonelle da terreno colturale 5; gli enterococchi da terreno colturale all'esculina (terreno colturale 6), ove compaiono in colonie circondate da alone bruno-nero; i lattobacilli da terreno colturale 7.

Nelle prove riportate in Tabella III si è usato uno solo dei ceppi isolati per ciascuna specie di Salmonelle, enterococchi e lattobacilli, perché già in precedenza, come è stato detto, la miscela completa di tutti i ceppi isolati non aveva portato a formazione di coprosterolo. I clostridi invece, che erano sembrati indispensabili alla riduzione sono stati spesso seminati in miscela nel brodo cervello.

Nella prova 10 si è usato il solo clostridio *e* che si è dimostrato capace unito al *coli* di dare una riduzione pur piccola del colesterolo a coprosterolo.

Per ora non si sono riuscite a realizzare le condizioni ottimali di coltura per avere una resa in coprosterolo simile a quella ottenuta dalla flora mista in nostro possesso; infatti il coprosterolo isolato dalle colture suddette è in piccole quantità, pari a pochi milligrammi per coltura; è probabile che, realizzando altre condizioni di sviluppo colturale, si possa giungere a rese quantitativamente ottimali.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI.

1° Una miscela di poche specie microbiche di origine fecale è atta *in vitro* e per un numero indefinito di risemine, sempre in adatte condizioni colturali, a saturare il doppio legame nella molecola del colesterolo. Tale flora risulta composta di più specie di batteri che isolati si possono riunire nei seguenti gruppi: anaerobi sporigeni (*Clostridium*), coliformi, Salmonelle, lattobacilli, enterococchi, *Proteus*, proteolitici aerobi tipo *subtilis*, *mesentericus*.

2° Un filtrato amicrobico del liquido colturale in cui sia avvenuta la trasformazione biologica dello sterolo insaturo, favorendo probabilmente lo sviluppo della microflora riducente il colesterolo, consente la formazione di coprosterolo in colture seminate con due soli ceppi attribuibili a *Clostridium sporogenes* ed *Escherichia coli*, che singolarmente non danno alcuna reazione.

3° I batteri riseminati, singolarmente o riuniti, in brodo cervello, ma privi del filtrato amicrobico non hanno dato la riduzione del colesterolo.

4° L'azione deprimente esercitata da alcuni sulfamidici ed antibiotici sulla formazione *in vivo* ed *in vitro* di coprosterolo, messa in evidenza da

altri Autori e da noi può avere così una valida spiegazione: alcuni clostridi risultano sensibili all'azione dei sulfamidici e di alcuni antibiotici; i batteri coliformi sono sensibili alle streptomidine ed alle tetracicline.

Nell'intestino animale e nelle nostre prove *in vitro* l'inibizione dovuta ai farmaci agiva probabilmente in particolare sulle due specie che sembrano essere responsabili della riduzione in istudio.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] S. BONDZYNSKI e V. HUMNICKI, «Z. physiol. Chem.», 22, 396 (1896).
- [2] O. ROSENHEIM e T. A. WEBSTER, «Bioch. J.», 37, 580 (1943).
- [3] S. J. THANHAUSER, «Klin. Wochenschr.», 13, 161 (1934).
- [4] H. DAM, «Biochem. J.», 28, 820 (1934).
- [5] H. DAM, «Biochem. J.», 28, 815 (1934).
- [6] G. BISCHOFF, «Biochem. Z.», 220, 211 (1930).
- [7] R. S. ROSENFELD, D. K. FUKUSHIMA, LEON HELLMAN e T. F. GALLAGHER, «J. Biol. Chem.», 211, 301 (1954).
- [8] A. KJAER SNOG, I. PRANCE e H. DAM, «J. gen. Microbiol.», 14, 256 (1956).
- [9] C. ARNAUDI e S. CARINI, «La Ricerca scientifica», 29, 2111 (1959).
- [10] D. L. COLEMAN, C. A. BAUMANN, «Arch. Biochem. Biophys.», 66, 226 (1957).
- [11] E. WAINFAN, G. HENKIN, L. I. RICE e W. MARX, «Arch. Biochem. Biophys.», 38, 187 (1952).
- [12] C. ARNAUDI e R. GHIRINGHELLI, «Boll. Soc. It. Biol. Sp.», 31, 10 (1955).
- [13] O. ROSENHEIM e T. A. WEBSTER, «Biochem. J.», 35, 8 (1941).
- [14] C. ARNAUDI e S. CARINI, «Rend. Lincei», Classe Sc. fis., mat. e nat., 30, 776 (1961).
- [15] C. ARNAUDI, S. CARINI, M. COCUCCHI e E. GALLI, «La Ricerca scientifica», 31 (II B), 87 (1961).
- [16] A. R. PREVOT, *Techniques pour le diagnostic des Bactéries Anaerobies*, Ed. de la Tournelle, St. Monde, Seine 1961.
- [17] WHITBY e HYNES', *Medical Bacteriology*, Ed. J. e A. Churchill, London.
- [18] V. PUNTONI, *Microbiologia medica*, Ed. Moderne, Roma 1958.
- [19] G. NOGADY, «Applied Microbiol.», 7, 314 (1959).
- [20] E. STAHL (*Mitteilung II*) «Chemischer Zeitung», 82, 323 (1958).
- [21] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, London 1948.