

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

MARIA CECILIA COCUCCI, ANNAMARIA FERRARI

**Riduzione dell'acido colico ad acido desossicolico ad  
opera di *Clostridium bifermentans* isolato da feci  
umane**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.6, p. 851–857.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_36\\_6\\_851\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_6_851_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/>



**Biochimica.** — *Riduzione dell'acido colico ad acido desossicolico ad opera di Clostridium bifermentans isolato da feci umane* (\*). Nota di MARIA CECILIA COCUCCI e ANNAMARIA FERRARI (\*\*), presentata (\*\*\*) dal Corrisp. C. ARNAUDI.

La riduzione dell'acido colico ( $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -triidrossicolanico) ad acido desossicolico ( $3\alpha$ ,  $12\alpha$ -diidrossicolanico), operata dai batteri intestinali, è stata oggetto di studio da parte di vari Autori, che l'hanno riprodotta *in vitro* in varie condizioni sperimentali. Tuttavia questa trasformazione è stata ottenuta sempre con colture miste di microrganismi e la ricerca della forma microbica o delle forme microbiche responsabili della riduzione è stata finora infruttuosa [1-2-3].

Soltanto Portmann in un lavoro del 1962 riferisce dell'isolamento di un microrganismo descritto come uno schizomicete a forma di bastoncino, Gram-negativo, immobile, che aveva operato la trasformazione in istudio, « apparentemente in coltura pura », ma solo al primo trapianto dopo l'isolamento da piastra.

In un precedente lavoro [4] abbiamo riferito di una coltura mista, proveniente da feci umane, che operava la riduzione dell'acido colico ad acido desossicolico mantenendo tale capacità indefinitamente nelle successive subcolture. Tale riduzione veniva da noi ottenuta successivamente con una coltura mista degli sporigeni facenti parte della coltura totale in presenza di *Escherichia coli*, indi con la coltura mista dei soli sporigeni anaerobi, ed infine con una coltura pura di un microrganismo anaerobio sporigeno.

Questa forma microbica è stata isolata da una coltura mista di sporigeni, ulteriormente selezionata per aggiunta di una concentrazione maggiore di acido colico.

In questo lavoro riferiamo dell'identificazione del microrganismo di cui sopra e delle condizioni sperimentali nelle quali si è ottenuta la trasformazione dell'acido colico ad acido desossicolico in colture pure successive.

#### MATERIALE E METODI.

*Condizioni colturali:* il mantenimento in coltura si effettuava in R.C.M. Oxoid in anaerobiosi in vaso di Politi [5] a  $37^{\circ}\text{C}$ .

*Identificazione del microrganismo:* oltre alle comuni prove per la determinazione delle caratteristiche morfologiche, colturali e biochimiche, per le

(\*) Lavoro eseguito presso il Centro di studio per le trasformazioni microbiche di idrocarburi, steroidi e derivati del Consiglio Nazionale delle Ricerche (diretto dal prof. C. Arnaudi).

(\*\*) Le ricerche descritte e la stesura della nota sono state compiute dagli autori in condizioni di assoluta parità (C. Arnaudi).

(\*\*\*) Nella seduta del 12 giugno 1964.

quali si sono utilizzate le usuali metodiche, si sono usati i seguenti terreni più specifici:

Brodo cervello: 2 % cervello di bue liofilizzato, 1 % peptone, 0,1 % glucosio, 0,001 % cisteina cloridrato;

Brodo VF: secondo Prevot [6];

R.C.M. Oxoid;

Agar sangue: secondo Puntoni [7];

Terreno al rosso d'uovo: secondo Pernice-Macri [8];

Albumi di uovo coagulato: secondo Puntoni [7];

Agar siero di sangue coagulato: secondo Puntoni [7];

Terreno alla cellulosa: secondo Pochon [9];

Pappa di patata: secondo De' Rossi [10].

La tossicità si è saggiata mediante inoculazione intramuscolo di colture di 24 ore in brodo glucosato su topi e ratti, la patogenicità mediante inoculazione sottocute e intraperitoneo di sospensioni di spore in soluzione fisiologica.

*Prodotti utilizzati:* acido colico B.D.H. (p. F. 198°C), acido desossicolico B.D.H. (p. F. 169-173°C).

*Condizioni di trasformazione:* La trasformazione dell'acido colico ad acido desossicolico veniva studiata sia con colture in accrescimento sia con cellule non proliferanti.

Nel primo caso il terreno di Marcus-Talalay [11], aggiunto dello 0,05 % di acido colico, veniva insemato con il 10 % di una coltura del microrganismo in R.C.M. Oxoid incubata in anaerobiosi per 4 giorni.

Nel secondo caso, cellule del microrganismo venivano fatte sviluppare in R.C.M. Oxoid in presenza dello 0,002 % di acido colico, oppure in presenza del 5 % del filtrato amicrobico della coltura mista di microrganismi intestinali [4]. Dopo 16 ore le cellule venivano centrifugate sterilmente ( $10.000 \times g$  a 5°C), lavate sempre sterilmente con tampone fosfatico (0,02 M, pH 7), indi sospese nello stesso tampone in presenza dello 0,05 % di acido colico, portando la sospensione a densità di 1.18. La lettura veniva effettuata allo spettrofotometro « Spekker Absorptiometer Hilger type H 760 » con filtro speciale per turbidimetria H 508, con vaschette da 0,25 cm.

*Separazione e riconoscimento del prodotto di trasformazione:* Le colture venivano estratte con una miscela di cloruro di metilene-acetato di etile (1 : 1 v/v); dopo disidratazione con solfato di sodio, l'estratto, portato a secco in corrente di azoto, veniva per un primo controllo cromatografato su piastre di gel di silice, preparate secondo la metodica di Barbier et al. [12]. Il sistema mobile usato era: benzolo - acetato di etile - acido acetico - H<sub>2</sub>O (11,5 : 10 : 2,5 : 1 v/v). Si rivelava con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (1 : 1 v/v) e altri rivelatori più specifici preparati secondo Anthony-Beher [13].

Un'aliquota dell'estratto (circa 6 mg) veniva indi sottoposta a cromatografia di ripartizione su colonna di Hyflo Supercel (Johns Manville Co.), resa idrofoba per esposizione a vapori di dimetildiclorosilano (Pierce Chemical Company, Rockford Illinois). La fase mobile usata era: metanolo

— H<sub>2</sub>O (58 : 42 v/v); la fase stazionaria: cloroformio-eptano (9 : 1 v/v). La metodica seguita era quella descritta da Bergström-Sjövall [14].

Le frazioni eluite (5 cc) dalla colonna venivano portate a secco e disciolte in 5 cc di alcool assoluto; 1 cc veniva di nuovo portato a secco e dopo aggiunta di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 65 % veniva letto allo spettrofotometro Zeiss mod. PMQ II per la determinazione quantitativa dei due acidi biliari [15]. Le lunghezze d'onda usate erano 318 m $\mu$  per l'acido colico, 310 m $\mu$  per l'acido desossicolico.

Gli spettri degli acidi biliari di controllo e del metabolita ottenuto nelle nostre esperienze venivano effettuati su Optica CF4-DB (Carlo Erba) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 65 % da 240 a 440 m $\mu$ .

#### RISULTATI SPERIMENTALI.

##### *Identificazione del microrganismo.*

**Caratteristiche morfologiche** - Le cellule vegetative, di forma a bastoncino diritto o leggermente incurvato, di dimensioni medie (1,2  $\times$  3-6  $\mu$ ), appaiono singole o spesso riunite nelle colture giovani in catene composte da 2 sino a 7-8 elementi; si notano anche lunghi filamenti. Mobili

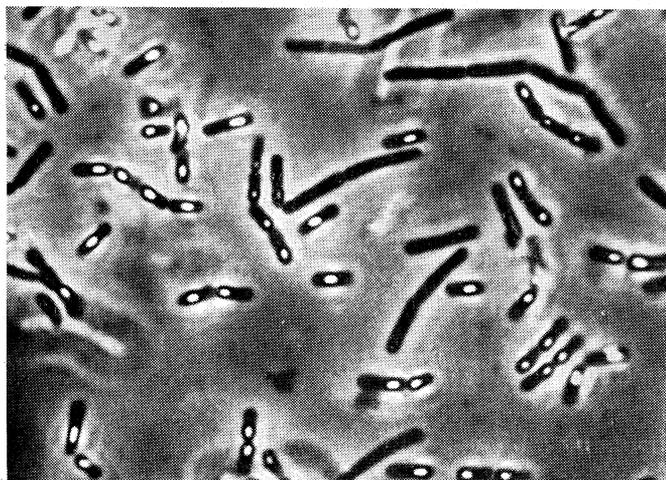


Fig. 1. - *Clostridium bifermentans*: preparato allestito da una coltura di 16 h in terreno R.C.M. Oxoid.

Osservazione a fresco a contrasto di fase. Ingr. 1500 $\times$ .

nei primi stadi di sviluppo, le cellule non tendono a rigonfiarsi notevolmente durante la formazione delle spore. Le spore di forma ellittica sono di solito situate in posizione subterminale, raramente appaiono centrali (fig. 1).

Cellule grampositive.

Caratteristiche colturali e biochimiche (condizioni anaerobiche).

*Agar comune inclinato*: scarsissimo sviluppo.

*Colonie superficiali in agar comune*: puntiformi.

*Colonie in profondità in agar comune*: piccolissime, bianco giallastre con centro più scuro e bordi più trasparenti irregolari.

*Colonie superficiali in terreno al rosso d'uovo*: colonie biancastre, di diametro medio (3-4 mm), non molto sopraelevate, a superficie non perfettamente liscia, lucida, non secca, con bordi lievemente irregolari e precipitato bianco, sottostante e intorno alla colonia, notevolmente debordante dalla colonia stessa, nessuno strato iridiscente.

*Colonie in profondità in Liver Veal Difco*: dapprima piccole lenticolari, di colore biancastro, assumono lentamente notevoli dimensioni.

*Brodo comune*: scarso sviluppo.

*Brodo glucosato*: buono sviluppo, sedimento mucoso di colore biancastro, produzione di  $H_2S$ , nessun annerimento.

*Brodo VF*: buono sviluppo sedimento mucoso di colore biancastro, produzione di  $H_2S$ , nessun annerimento.

*Brodo R.C.M. Oxoid*: ottimo sviluppo, sedimento mucoso, nessun annerimento, produzione di  $H_2S$ .

*Brodo cervello*: buono sviluppo senza annerimento.

*Agar sangue inclinato*: scarso sviluppo, nessuna evidente emolisi.

*Colonie in agar VF aggiunto di sangue*: lieve emolisi intorno alle colonie.

*Albumina d'uovo coagulata*: digerita completamente ed annerita.

*Agar siero di sangue coagulato*: digerito ed annerito.

*Pappa di patata*: nessuna idrolisi dell'amido.

*Latte*: completamente digerito.

*Cellulosa*: inattaccata anche con aggiunta al terreno base di piccole quantità di R.C.M. Oxoid.

*Gelatina*: totalmente fluidificata ed annerita, produzione di  $H_2S$ .

*Nitrati*: non vengono ridotti a nitriti, nitrati presenti.

*Indolo*: prodotto in tracce.

$H_2S$ : viene prodotto in grande quantità.

*Acqua peptonata*: buono sviluppo, inalterato il pH (7).

*Idrati di carbonio in acqua peptonata*: acidifica notevolmente glucosio (pH 4,5) fruttosio (pH 5), inulina (pH 5), sorbite (pH 5); acidifica lievemente la glicerina (pH 6). Nessuna azione su lattosio, galattosio, mannite, amido, destrina, saccarosio, salicina.

*Optimum di temperatura*: 37° C. Discreto sviluppo anche a 20° C e a 45° C. Anaerobico stretto.

Non patogeno e non tossico per topi e ratti.

Consultati il *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [16], il *Traité de Systématique Bactérienne* di Prévot [17] e l'*Anaerobic Bacteriology*

in *Clinical Medicine* di Willis [18], il microrganismo in esame è risultata classificabile come *Clostridium bifermentans* (Weinberg and Séguin) Bergey et al.

#### Esperienze con cellule non proliferanti.

Dopo 3-4 giorni di incubazione a 37° C in vaso di Politi, le sospensioni di cellule, preparate come descritto nei metodi, venivano estratte. Esse si rivelavano all'esame al microscopio a contrasto di fase costituite esclusivamente da spore.

Dopo aver constatato con cromatografia su strato sottile la presenza di un prodotto di trasformazione dell'acido colico con  $R_f$  e reattività cromatica

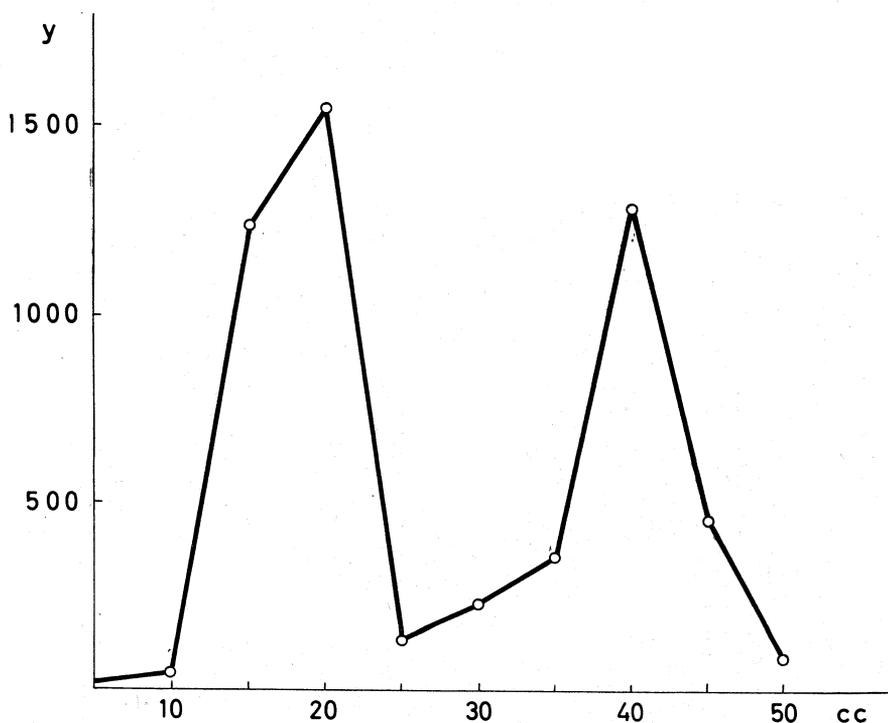


Fig. 2. - Separazione dell'acido colico (mg 2,98) e dell'acido desossicolico (mg 2,40). Fase stazionaria: 4 cc cloroformio-eptano (9:1). Fase mobile: metanolo-acqua (58:42). Hyflo Supercel idrofobo: 4,5 gr.

corrispondenti a quelli dell'acido desossicolico, si procedeva alla separazione su colonna dei due acidi biliari.

La separazione dei due steroli veniva controllata sia cromatograficamente che spettrofotometricamente utilizzando come controlli acido colico ed acido desossicolico del commercio, previamente purificati sulla colonna di ripartizione descritta.

Riportiamo i risultati di una esperienza effettuata con cellule sviluppatesi in presenza di acido colico: le figure 2 e 3 dimostrano rispettivamente la

separazione cromatografica dei due acidi biliari e l'identità dello spettro di assorbimento fra il metabolita in esame e l'acido desossicolico di controllo.

Numerose esperienze da noi effettuate con cellule non proliferanti di *Cl. bifermentans* hanno riprodotto qualitativamente i risultati dianzi esposti, tuttavia le quantità di acido desossicolico ottenuto variano dal 10% al 44% rispetto alla quantità di acido colico di partenza.

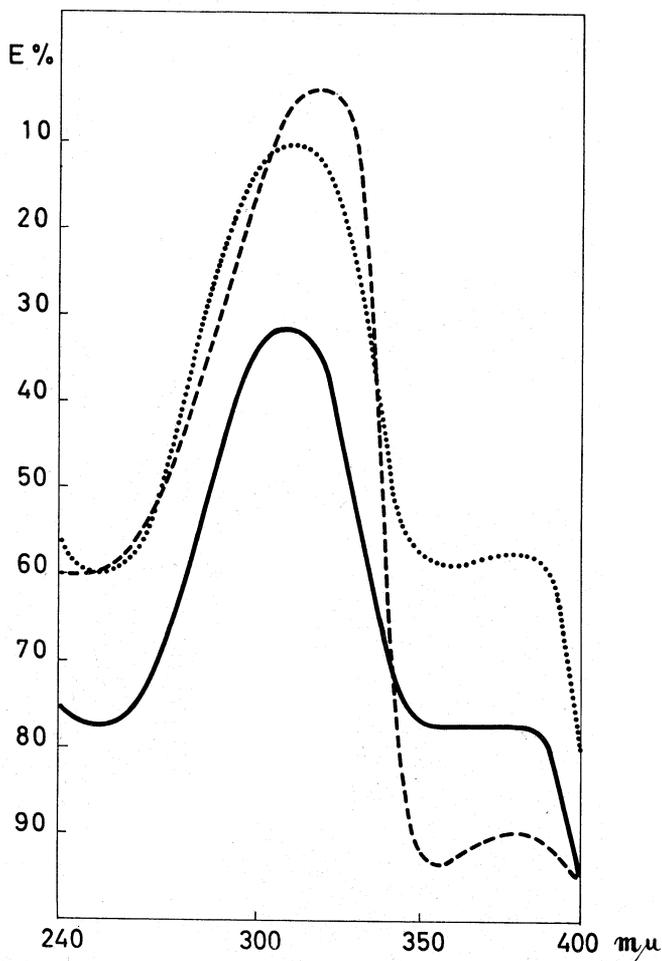


Fig. 3. - Spettri di assorbimento dell'acido colico (---), dell'acido desossicolico (.....) e dell'acido desossicolico di trasformazione (—), in  $H_2SO_4$  al 65 %.

#### Esperienze con cellule in accrescimento.

Le colture di *Cl. bifermentans* in terreno di Marcus-Talalay, allestite come descritto nei metodi, dopo 6 giorni di incubazione si presentavano quasi completamente sporificate. L'esame cromatografico degli estratti rivelava la presenza dell'acido desossicolico.

In queste condizioni colturali la presenza del filtrato amicrobico di una coltura mista totale, attiva nella trasformazione dell'acido colico ad acido desossicolico, sembrava favorire la trasformazione in istudio.

#### CONCLUSIONI.

Uno stipte di *Clostridium bifermentans*, isolato da feci umane, è capace *in vitro* di ridurre l'acido colico ad acido desossicolico. Il microorganismo si è dimostrato in grado di operare la trasformazione sia in accrescimento che allo stato di cellule non proliferanti.

Non siamo ancora in grado di controllare il rendimento della trasformazione, in quanto nelle nostre esperienze la quantità di acido desossicolico riscontrato varia, apparentemente senza alcuna ragione, dal 10% al 44% rispetto alla quantità dell'acido colico di partenza.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. NORMAN, S. BERGMAN, «Acta Chemica Scand.», 14, 1781 (1960).
- [2] A. NORMAN, M. S. SHORB, «Proc. Soc. Exp. Biol.», 110, 552 (1962).
- [3] O. W. PORTMAN, S. SHALS, A. ANTONIS, B. JORGENSEN, «Proc. Soc. Exp. Biol.», 109, 59 (1962).
- [4] M. C. COCUCCI, A. FERRARI, «Rend. Ist. Lomb. Sci. Lett. (Cl. Sci.)», 97, 398 (1963).
- [5] I. POLITI, *Atti VI Congr. Naz. Microbiol.*, Milano, 751 (1937).
- [6] A. R. PRÉVOT, *Techniques pour la diagnostic des bacteries anaerobies*, Ed. De la Torelle. Paris (1960).
- [7] V. PUNTONI, *Microbiologia Medica*, Ed. Moderne, Roma (1958).
- [8] A. PERNICE, N. MACRÌ, «Ann. Microbiol.», 12, 51 (1962).
- [9] J. POCHON, Y. TCHAN, *Préces de Microbiologie du sol*, Masson, Paris (1940).
- [10] G. DE ROSSI, *Microbiologia agraria e tecnica*, R.E.D.A. (1950).
- [11] P. MARCUS, P. TALALAY, «J. Biol. Chem.», 218, 661 (1956).
- [12] M. BARBIER, H. JAGER, H. TOBIS, E. WYNN, «Elvetica Chim. Acta», 42, 2440 (1959).
- [13] W. L. ANTHONY, W. T. BEHER, «J. Chromatogr.», 13, 567 (1964).
- [14] S. BERGSTRÖM, J. SJÖVALL, «Acta Chem. Scand.», 5, 1267 (1951).
- [15] L. C. KIER, «Lab. Clin. Med.», 40, 755 (1952).
- [16] R. S. BREED, E.G.D. MURRAY, A. P. HITCHENS, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. (1948).
- [17] A. R. PRÉVOT, *Traité de Systématique Bactérienne*, Dunod, Paris (1961).
- [18] A. TREVOR WILLIS, *Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine*, Butterworth, London (1960).