
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANNAMARIA FERRARI

Accumulo di acido desossicolico da acido colico, in vitro, ad opera di microrganismi fecali

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.5, p. 576–587.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_5_576_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. — *Accumulo di acido desossicolico da acido colico, in vitro, ad opera di microrganismi fecali* (*). Nota di ANNAMARIA FERRARI, presentata (**) dal Corrisp. C. ARNAUDI.

SUMMARY. — A highly selected mixed culture of very few species of fecal microorganisms effects *in vitro* the complete transformation of cholic acid with a remarkable yield of only deoxycholic acid. This culture shows optimal rates of transformation, under anaerobic conditions, at neutral and alkaline pH with growing cells and washed cells. It is also able to effect 7β -dehydroxylation of 7 -epicholic acid accumulating deoxycholic acid, while it is unable to 7α -dehydroxylate chenodeoxycholic acid. The same culture also yields deoxycholic acid from 7 -chetodeoxycholic acid and taurocholic acids.

The numerous strains isolated from this culture are only ascribable to six microbial species: two to genus *Clostridium*, three to genus *Streptococcus*, one to genus *Micrococcus*.

The morphological, physiological and biochemical characteristics of the above strains are reported; their taxonomy and activity on cholic, 7 -chetodeoxycholic and deoxycholic acids have been examined.

I microrganismi intestinali attivi sugli acidi biliari influenzano indirettamente il metabolismo di queste sostanze e del colesterolo nell'uomo e negli animali superiori [1-4]. La microflora intestinale infatti, interviene sugli acidi biliari operando reazioni di deconiugazione, deossidrilazione, ossidazione e riduzione dando luogo a un complesso miscuglio di prodotti derivati. È noto comunque che gli acidi biliari, prodotti terminali del metabolismo del colesterolo, vengono in parte riassorbiti e riutilizzati dal fegato ed in parte eliminati essenzialmente con le feci; inoltre nel fegato la sintesi ex novo degli acidi biliari dal colesterolo è omeostaticamente regolata dalla concentrazione di essi nel sangue portale cioè dalla quantità di essi che viene riassorbita [5-7]. Si consideri che il principale fattore influenzante l'eliminazione degli acidi biliari è la loro trasformazione in prodotti metabolici più o meno riassorbibili ad opera della microflora intestinale [8].

Gli acidi biliari sono inoltre necessari per il riassorbimento del colesterolo da parte della parete intestinale, rappresentando essi i co-fattori della attività della colesterolo-esterasi; mediante determinazioni del livello del colesterolo ematico è stato riscontrato che il grado della azione da essi esplicata sull'assorbimento del colesterolo è corrispondentemente sempre minore in rapporto al numero degli ossidrili presenti nella loro molecola [9, 10].

Indirettamente quindi la composizione e le condizioni di attività della microflora intestinale influiscono sull'apporto al fegato degli acidi biliari, influenzando in tal modo la quantità di colesterolo che viene trasformata

(*) Ricerche finanziate dal Consiglio Nazionale delle Ricerche ed effettuate presso l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Milano.

(**) Nella seduta del 10 maggio 1969.

in acidi biliari e la sintesi del colesterolo stesso da parte del fegato [5]; inoltre esplicano un'azione sul riassorbimento intestinale del colesterolo.

Il metabolita più interessante dell'acido colico è l'acido desossicolico. Questo composto che costituisce nell'uomo il 20% circa degli acidi della bile, parzialmente riassorbibile e, nell'uomo e nel coniglio, non riidrossilabile dal fegato, viene prodotto unicamente dall'attività dei microrganismi intestinali in grado di deossidrilare in C₇ l'acido colico [5, 11-13].

I tentativi di isolamento in coltura pura dei microrganismi capaci di compiere *in vitro* tale trasformazione sono stati per anni infruttuosi. La riduzione si otteneva soltanto con colture miste di microrganismi fecali [14, 15] senza che tuttavia siano state chiarite le condizioni nelle quali ben determinate miscele di microrganismi realizzavano tale trasformazione. Per questa ragione il meccanismo della trasformazione è stato studiato sinora *in vivo* da Samuelsson [16], senza entrare in particolari sugli enzimi responsabili. Secondo l'autore, che ha utilizzato acidi biliari stereospecificatamente marcati con tritio, il meccanismo di questa reazione *in vivo* consisterebbe in una deidratazione dell'acido colico a Δ^6 - derivato insaturo, seguita da una riduzione del doppio legame.

Portmann [17] in un lavoro del 1962 riferisce di aver ottenuto la riduzione dell'acido colico in acido desossicolico con una coltura mista di microrganismi fecali di ratto anche dopo diversi trapianti, mentre una forma microbica isolata risultata attiva in coltura pura, perdeva questa capacità nelle successive subcolture.

Recentemente Gustafsson, Midtvedt e Normann [18-22] della scuola scandinava, a seguito di una serie di indagini su numerosi microrganismi intestinali riferiscono di aver isolato da feci di ratto e uomo una sola forma microbica anaerobica in grado di effettuare l' α -deossidrilazione in C₇ dell'acido colico. Tale microrganismo tuttavia opererebbe anche l'ossidazione in C₃ e C₁₂ dell'acido desossicolico formato.

Peraltro Hill e Drasar [23, 24] riportano di aver riscontrato che molti ceppi di *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Veillonella* spp., e *Streptococcus faecalis* riducevano il colato di sodio accumulando desossicolato. Questi risultati non sembrerebbero in armonia con la più nota letteratura sull'argomento.

Le nostre indagini su questo tema di studio possono essere così richiamate.

L'accumulo *in vitro* di acido desossicolico da acido colico si è dapprima ottenuto con colture miste di microrganismi fecali di ratto e di uomo. Tali colture erano in grado di mantenere questa attività nelle successive numerose subcolture [25, 26]. Da una subcoltura proveniente da feci umane è stato isolato un ceppo che, dalle prove morfologiche, colturali e biochimiche, è risultato ascrivibile a *Clostridium bifermentans*, capace di deossidrilare l'acido colico accumulando acido desossicolico [27]. In un secondo tempo sono stati isolati [28] altri 12 ceppi della stessa specie in grado di operare la trasformazione con accumulo di acido desossicolico sia come cellule in accresci-

mento che non proliferanti. Tuttavia, analogamente a quanto riscontrato da Portmann, tutti i ceppi in istudio perdevano nei successivi trapianti tale capacità, pur mantenendosi in grado di ossidare l'acido colico in acido 7-chetodesossicolico. Anche variando l'età delle colture, utilizzando altri substrati, variando le concentrazioni di acido colico, aggiungendo attivatori metabolici e filtrati amicrobici di colture miste, non si è più ottenuto da questi stipiti accumulo di acido desossicolico [28-30].

Successivamente la trasformazione è stata ottenuta con una coltura selezionata derivante da una coltura mista di microrganismi fecali di uomo. La selezione è stata effettuata per diluizioni successive e la coltura ottenuta è risultata costituita da relativamente poche forme microbiche rispetto a quelle presenti nella coltura fecale di partenza. Tale coltura selezionata mantiene la capacità di accumulare acido desossicolico nelle successive subcolture (a tutt'oggi circa 500), risultando altamente attiva. Esperienze con acido colico 24-C^{14} hanno dimostrato infatti che dopo sei giorni di incubazione l'acido desossicolico rappresenta circa il 90 % delle sostanze di natura steroidica ritrovabili nell'estratto etereo della coltura (vedi Tabella 1 in [30]).

I numerosissimi isolamenti effettuati dalla coltura hanno consentito di ottenere alcuni ceppi ascrivibili alle specie *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* in grado di accumulare acido desossicolico da acido colico; tuttavia, come riscontrato per *Cl. bifermentans*, tale capacità è stata perduta nei successivi trapianti, pur dimostrandosi essi in grado di degradare più profondamente l'acido colico in prodotti non steroidici. Fra gli altri ceppi isolati, ascrivibili a più specie microbiche, alcuni si sono dimostrati inattivi nell'acido colico, altri in grado di degradarlo completamente, altri di metabolizzarlo diversamente.

Associazioni varie dei suddetti microrganismi non hanno ridotto l'acido colico accumulando acido desossicolico.

Una ulteriore selezione della coltura ci ha consentito di ottenere [30] una nuova coltura mista ridotta a pochissime forme microbiche anch'essa in grado di ridurre l'acido colico con notevole accumulo di acido desossicolico.

In questa Nota si riportano le ricerche effettuate su tale coltura attiva altamente selezionata.

METODI.

Condizioni culturali. La coltura mista utilizzata (subcoltura fecale C) è stata ottenuta in una precedente ricerca per selezioni successive da una coltura mista proveniente da feci umane (vedi schema passaggi per selezioni da feci in [30]).

La coltura veniva mantenuta in terreno di Marcus-Talalay (M.T.) [31] contenente lo 0.05 % di colato di sodio. Le colture venivano fatte sviluppare in anaerobiosi in vaso di Politi [32] a 37° C. I trapianti venivano effettuati inoculando in ragione del 5 %.

Condizioni di trasformazione degli acidi biliari. Per le trasformazioni degli acidi biliari da parte della coltura mista in accrescimento si utilizzava il terreno M.T. L'attività esplicata sugli acidi biliari dei singoli microrganismi isolati veniva saggiata sia in anaerobiosi che in aerobiosi con cellule in accrescimento in Todd-Hewitt Broth Oxoid (T.H.) e con cellule lavate non proliferanti in tampone fosfatico 0.02 M (pH 7).

Isolamento dei microrganismi. È stato effettuato in condizioni di aerobiosi e anaerobiosi, per diffusione e per striscio, mediante i seguenti terreni colturali: Nutrient Agar Difco e Liver Veal Agar Difco tali o addizionati del 5 % di sangue defibrinato di cavallo o di 2 mg/l di cristal violetto; terreno per Batteroidi [33]; V. L. Agar [34] e R. C. M. Oxoid agarizzato aggiunto del 5 % di sangue defibrinato di cavallo; agar esculina [35]; Endo Agar Difco; Mitis Salivarius Agar Oxoid; Enterococcus Agar Difco; terreno di Barnes [36]; Todd Hewitt Broth Oxoid agarizzato aggiunto di cristal violetto in ragione di 2 mg/l; agar malto.

Identificazione dei microrganismi. Le comuni prove morfologiche, colturali e biochimiche preliminari sono state ulteriormente integrate da successivi rilevamenti, utilizzando terreni di base diversi a seconda del genere di appartenenza dei singoli ceppi.

Per la differenziazione dei micrococchi dagli stafilococchi sono state utilizzate le prove suggerite dall'International Subcommittee on Staphylococci and Micrococci, 1965 [37].

Per l'identificazione dei micrococchi si sono usati i terreni secondo Baird-Parker [38]. Per gli streptococchi sono stati usati anche i seguenti terreni specifici: brodo arginina secondo Abd-el-Malek and Gibson [39]; agar esculina secondo Edwards [35]; brodo Lemco glucosio secondo Shattock and Hirsch [40] per la tollerabilità a pH diversi; Glucose Phosphate Broth Difco per il test di Voges-Proskauer; latte secondo Abd-el-Malek and Gibson [39] per la prova di riduzione del blu di metilene; brodo Lemco lievito-glucosio secondo Naylor e Sharpe [41] aggiunto di NaCl per la tollerabilità a questo sale; terreno base per i carboidrati secondo Hugh and Leifson [42]; agar lievito glucosio aggiunto di tellurito secondo Skadhauge [43].

Per le prove fisiologiche di identificazione dei clostridi si è anche utilizzato, come terreno base il terreno di Beerens [44] tale o addizionato di glucosio allo 0,1 % e di Na_2HPO_4 allo 0,4 % ed i seguenti terreni specifici: Brain Heart Infusion Difco; terreno al rosso d'uovo secondo Willis e Hobbs [45]; siero di Loeffler Difco; albume d'uovo coagulato secondo Puntoni [46].

Per le prove di tolleranza alla bile si è utilizzato Bacto-Oxgall Difco.

Estrazione e riconoscimento dei prodotti di trasformazione degli acidi biliari; separazione dell'acido desossicolico. L'estrazione con solventi organici, le cromatografie su strato sottile e la separazione dell'acido desossicolico sono stati effettuati come descritto precedentemente [30].

Preparati per osservazioni al microscopio elettronico. La coltura mista veniva centrifugata 20000 per 20' ed i singoli ceppi isolati a 8000 per 20'; si procedeva quindi come già descritto [30].

Prodotti utilizzati. Acido colico (3_{α} , 7_{α} , 12_{α} -triidrossicolanico) e desossicolico (3_{α} , 12_{α} -diidrossicolanico) BDH, ripurificati su colonna. L'acido 7-chetodesossicolico (7-cheto- 3_{α} , 12_{α} -diidrossicolanico) è stato preparato secondo Fieser e Rajagopalan [47], l'acido 7-epicolico (3_{α} , 7_{β} , 12_{α} -triisocilanico) secondo Samuelsson [48], presso l'Istituto di Chimica Organica della Facoltà di Scienze dell'Università di Milano.

RISULTATI SPERIMENTALI.

La coltura in esame (subcoltura fecale C [30]), spontaneamente variatasi e stabilizzatasi in seguito ad una cinquantina di trapianti, presenta all'esame microscopico, sia ottico che elettronico, un aspetto diverso da quello osservato per la stessa coltura dopo pochi trapianti.

Inoltre, per quanto riguarda l'attività sull'acido colico, pur mantenendo il tipico andamento di trasformazione osservato precedentemente, si può constatare che è in grado di trasformare completamente questo acido, accumulando esclusivamente acido desossicolico. Infatti alla fine della trasformazione, altre sostanze di natura steroidica, prima riscontrate, compaiono in cromatografia in tracce tali da rilevarsi solo all'U.V. e per di più molto debolmente.

Esame microscopico. La coltura, dopo 48 h di incubazione, mostra la presenza di pochissime forme microbiche. In essa si osservano forme sporigene: spore ellittiche isolate e grossi bastoncini Gram-positivi contenenti queste spore, spore tondeggianti libere o più spesso portate apicalmente da bastoncini sottilissimi Gram-negativi; forme cocciche: cocchi oblungi e altri tondeggianti di diverse dimensioni che appaiono isolati, a due, a quattro, in catena o a gruppi.

Ripetuti esami al microscopio elettronico hanno confermato la presenza di questi soli microrganismi riscontrati al microscopio ottico.

Attività sugli acidi biliari. La coltura compie la completa trasformazione in circa 5 gg di incubazione in anaerobiosi a 37°C. Inoltre è in grado di mantenere l'attività deossidrilante l'acido colico anche dopo numerosi trapianti effettuati in terreno privo di tale sostanza e allo stato di cellule non proliferanti. È anche capace di accumulare acido desossicolico in terreni contenenti solo tryptone Oxoid al 20% o Lab-Lemco Beef Extract al 10% ed in terreno T.H. In questo terreno mantiene l'attività sino alla concentrazione del 5% di colato di Na. Sottoponendo la coltura a variazioni di pH e di temperatura è risultata in grado di accumulare acido desossicolico da

acido colico da pH 6 a pH 9 a 30–37°C, a pH 7 a 45°C mentre è inattiva a tutti i pH a 50°C. In aerobiosi in agitazione non risulta attiva e, se pasteurizzata, produce da acido colico acido 7-chetodesossicolico. Produce acido desossicolico anche dagli acidi 7-chetodesossicolico e 7-epicolico, sebbene questo acido venga trasformato soltanto in parte. È inoltre in grado di decougiare l'acido taurocolico mentre non trasforma in alcun modo l'acido chenodesossicolico né in terreno M.T., né in T.H.

Operando con diluizioni successive a base 10 si è constatato che la diluizione massima, con la quale si riesce ad ottenere la trasformazione inoculando 1 cc di essa in 20 cc di M.T. con colato di Na, è la diluizione 10^{-3} . Partendo da quest'ultima diluizione, su 10 repliche, soltanto una dà generalmente la trasformazione, mentre tutti gli inoculi effettuati dalla diluizione precedente risultano attivi.

Isolamento dei microrganismi. Dalla coltura sia mantenuta in condizioni normali di trasformazione, sia sottoposta a variazioni di pH, temperatura e tensione O₂, si sono effettuati numerosi isolamenti con terreni liquidi e solidi, comuni, speciali ed elettivi, in aerobiosi ed anaerobiosi.

Di seguito vengono riportate le caratteristiche morfologiche, colturali e biochimiche di un ceppo rappresentativo per ogni specie microbica isolata. Dei ceppi in esame 15 hanno presentato le stesse caratteristiche del ceppo *SD*; 11 del ceppo *SK*; 30 del ceppo *B*₁; 25 del ceppo *LV*₃; 23 del ceppo *E*₂ e 9 del ceppo *G*₂.

cp. *SD*

Già isolato precedentemente per cui si rimanda alla descrizione esposta [27].

cp. *SK*

Microrganismi a forma di sottili bastoncini di varia lunghezza (0,4–0,6 × 2–4,5 μ); talora si osservano forme molto allungate. Producono, in posizione terminale, spore di forma tondeggianti dal diametro sensibilmente maggiore rispetto alla larghezza della relativa forma vegetativa; al microscopio elettronico è visibile l'esosporio. Le cellule, anche giovani, presentano zone di maggiore o minore opacità al raggio elettronico. Mobile con flagelli peritrichi in colture molto giovani. Gram-negativo.

Si sviluppa in terreni liquidi con torbidità uniforme generalmente producendo gas. Cresce ottimamente in 24 h in R.C.M. Oxoid, in terreno di Beerens [44] (B.M.) tale o addizionato di glucosio e di NaHPO₄, in brodo T.H. ed in brodo cervello; in questi terreni tuttavia le forme vegetative non giungono alla sporificazione e dopo 48 h circa si lisano completamente. In terreno contenente esclusivamente estratto di lievito lo sviluppo è scarso ma dopo 24 h si giunge alla sporificazione. In terreno B.M. agarizzato allo 0,6 % presenta ottimo sviluppo con formazione di spore. Non produce annerimento in terreno al cervello.

Le colonie in profondità in Liver Veal Agar Difco sono dapprima piccole, lenticolari, di colore marrone chiaro e assumono lentamente, a temperatura ambiente, dimensioni maggiori espandendosi in direzioni diverse; si osserva produzione di gas. Le colonie in superficie sullo stesso terreno, dopo 24 h di incubazione, si presentano circolari, poco sopraelevate, a bordi regolari, lucide, lisce, color bianco crema, mentre aggiungendo sangue defibrinato di cavallo sono più piccole, tondeggianti, a margini irregolari, di colore grigio. Su terreno al rosso d'uovo sono piccole, leggermente sopraelevate; mancano zone di opacità nel terreno circostante la colonia e non si osserva iridescenza.

Non fluidifica la gelatina. Riduce il latte tornasolato e lo coagula dopo circa 15 giorni con produzione di gas. Le proteine coagulate non vengono liquefatte. Produce acido e gas da: trealosio, cellobiosio, mannitolo, fruttosio, maltosio, lattosio, melibiosio e glucosio. Non fermenta: sorbitolo, arabinosio, glicerolo, xilosio, inulina, saccarosio e raffinosa. Non cresce in presenza di bile a concentrazioni superiori al 10 %.

Non produce H₂S e indolo. Non riduce i nitrati.

Microaerofilo. Optimum di temperatura a 37°C; a 20°C sviluppo scarso dopo 72 h; a 30°C buono sviluppo dopo 24 h; a 45°C nessuno sviluppo. Le spore resistono a 100°C per 5'.

È avvicicabile per parecchie caratteristiche a *Clostridium indolis* McChung e McCoy, descritto nel Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [49] (*Therminosporus indologenes* Bezzak Prevot).

cp. B₁

Cellule che si presentano di solito a due o in catene, lievemente allungate in direzione della catena, del diametro di circa 0,5 μ. Gram-positivo. Immobile.

Appartiene al gruppo sierologico D di Lancefield.

Sul sangue è debolmente α emolitico.

Microaerofilo. Cresce a 10°C, a 40°C, a 45°C ma non si sviluppa a 50°C. Sopravvive al trattamento a 60°C per 30'.

Cresce in brodo contenente il 6,5 % di NaCl e in tellurito allo 0,04 %. Si sviluppa a pH 9,6, acidificando il mezzo (pH finale: 4,4). Non si sviluppa in latte contenente lo 0,1 % di blu di metilene ed è in grado di crescere in presenza di bile in concentrazioni superiori al 40 %. Non coagula il latte. Non fluidifica la gelatina. Produce acido da: maltosio, lattosio, sorbitolo, saccarosio, mannitolo, salicina, trealosio; nessuna produzione da: arabinosio, melibiosio e inulina. Produce acido da glicerolo in anaerobiosi stretta. Amido ed esculina non vengono idrolizzati. Produce NH₃ da arginina. La reazione di Voges-Proskauer è negativa.

Secondo Shermann [49], Deibel [50] e il Bergey's Manual of Determinative Bacteriology è ascrivibile a *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder.

cp. *LV*₃

Cellule tondeggianti di diametro 0,7–0,9 μ ; si presentano di solito a coppie o in catena. Gram-positivo. Immobile.

Appartiene al gruppo sierologico N di Lancefield.

Sul sangue è da debolmente α a γ emolitico.

Microaerofilo. Cresce a 10°C, a 40°C, a 45°C e a 50°C. Sopravvive a 60°C per 30'.

Cresce in brodo contenente il 4 % di NaCl. Si sviluppa a pH 9,6 acidificando il mezzo (pH finale: 4,5). Si sviluppa in latte contenente lo 0,1 % di blu di metilene ed è in grado di crescere in presenza di concentrazioni di bile superiori al 40 %. Non si sviluppa su agar-tellurito allo 0,04 %. Coagula il latte con coagulo compatto. Non fluidifica la gelatina. Produce acido da: maltosio, lattosio, mannitolo, melibiosio, salicina, trealosio, esculina, saccarosio. Nessuna produzione di acido da: sorbitolo e inulina. L'amido non viene idrolizzato mentre l'esculina è idrolizzata. Produce NH₃ da arginina. La reazione di Voges-Poskauer è positiva.

Poiché appartiene al gruppo sierologico N di Lancefield, rientrerebbe nel gruppo degli Streptococchi lattici. Tuttavia secondo la classificazione di Shermann [49] e del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology presenta caratteristiche comuni agli enterococchi come la capacità di svilupparsi ad alte temperature (50°C) e a pH 9,6.

cp. *E*₂

Cellule ovoidali, allungate nella direzione della catena (0,4 × 0,6–0,9 μ). Si presentano a coppie o in catene. Gram-positivo. Immobile.

Appartiene al gruppo sierologico N di Lancefield.

Sul sangue è lievemente α emolitico; patina lievemente verdastra.

Microaerofilo. Cresce a 10°C, a 40°C ma non a 45°C. Non sopravvive dopo trattamento a 60°C per 30'.

Cresce in brodo contenente il 6,5 % di NaCl e possiede scarsa tolleranza alla tellurite allo 0,04 %. Si sviluppa a pH 9,2 e a pH 9,6. Cresce in latte contenente lo 0,1 % di blu di metilene, senza coagularlo. È in grado di svilupparsi in presenza di concentrazioni di bile superiori al 40 %.

Lascia inalterato il latte tornasolato. Non fluidifica la gelatina. Il pH finale in brodo glucosato è 4,5. Produce acido da: maltosio, lattosio, sorbitolo, glicerolo, mannitolo, arabinosio, melibiosio, inulina, saccarosio. Nessuna produzione da: salicina e trealosio. Amido ed esculina non vengono idrolizzati. Produce NH₃ da arginina. La reazione di Voges-Proskauer è negativa.

Secondo i criteri di Shermann [49] e del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology è ascrivibile alla specie *Streptococcus lactis* dalla quale differisce perché in grado di svilupparsi a pH 9,6.

cp. *G*₂

Cellule sferiche del diametro di 0,4–0,6 μ , che appaiono isolate, a coppie, a quattro e a gruppi. Gram-positivo. Immobile.

Su agar si sviluppa con patina secca granulare; in brodo producendo pellicola superficiale e fine deposito. Le colonie su agar sono piccole, piatte, con margini irregolari. Il pigmento è giallo arancio chiaro in T.H., color crema su Nutrient Broth Agar Difco.

Produce acido da glucosio in aerobiosi; nessuna produzione in anaerobiosi. Il pH finale in terreno glucosato è 5,1. Non produce coagulasi e fosfatasi. La reazione di Voges Proskauer è negativa. Produce acido in aerobiosi da: lattosio, arabinosio, maltosio, mannitolo, salicina, glicerina, xilosio. Non produce acido da cellobiosio e raffiniosio. Non idrolizza l'esculina. Idrolizza l'amido e l'ippurato di sodio. Presenta ottimo sviluppo, ma nessuna idrolisi, su burro, tributirina e Tween 20, 40, 60, 80. Coagula il latte. Fluidifica la gelatina. Chiarifica la caseina e l'emulsione d'uovo. Produce NH_3 da arginina. Si sviluppa in presenza di NaCl al 6,5 %.

Aerobio. Cresce a 10°C, mentre non si sviluppa a 45°C. Sopravvive a 60°C per 30'.

Non produce H_2S e indolo. Riduce i nitrati a nitriti. Produce catalasi. Non esplica alcuna azione sul sangue.

Secondo la classificazione di Baird-Parker [51] sembra appartenere al sottogruppo V del gruppo dei Micrococchi.

Attività dei microrganismi isolati sugli acidi colico, 7-chetodesossicolico e desossicolico. Di ciascuna specie isolata, 9 ceppi sono stati saggiati sui sali sodici degli acidi colico (0,05 %), 7-chetodesossicolico (0,05 %) e desossicolico (0,01 %), come cellule in accrescimento e non proliferanti, in presenza ed in assenza di O_2 . I ceppi isolati non sono in grado di trasformare con accumulo di acido desossicolico né acido colico, né 7-chetodesossicolico. Gli stipiti riferibili a *Cl. bifermentans*, in anaerobiosi ed aerobiosi, ossidano il gruppo ossidrilico dell'acido colico con formazione di acido 7-chetodesossicolico; peraltro, in alcuni casi, in anaerobiosi, oltre a questa sostanza si è osservata la presenza in tracce di un composto avente mobilità cromatografica dell'acido desossicolico. I ceppi appartenenti alla sopraddetta specie, generalmente riducono l'acido 7-chetodesossicolico in acido colico in assenza di O_2 . Nessun altro microrganismo isolato si è dimostrato in grado di metabolizzare gli acidi colico, 7-chetodesossicolico e desossicolico.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI.

L' α -deossidrilazione in C_7 , *in vitro*, dell'acido colico è stata ottenuta mediante una coltura mista selezionata proveniente da feci umane e ridotta ad un numero esiguo di specie microbiche. Questa coltura, che mantiene tale attività nelle successive subcolture, risulta altamente attiva poiché è in grado di trasformare completamente l'acido colico accumulando soltanto acido desossicolico in notevole quantità. È risultata inoltre capace di compiere anche la 7β -deossidrilazione dell'acido 7-epicolico e di produrre acido desossicolico anche da acido 7-chetodesossicolico.

In seguito agli isolamenti effettuati dalla coltura si sono ottenuti numerosi ceppi esclusivamente ascrivibili a sei specie microbiche, due delle quali appartenenti al genere *Clostridium*, tre al genere *Streptococcus*, una al genere *Micrococcus*. In base alle proprietà morfologiche, colturali e biochimiche, una specie è identificabile con *Clostridium bifermentans*, una avvicicabile a *Clostridium indolis*; fra gli streptococchi alcuni stipiti sono riferibili alla specie *Streptococcus lactis*, altri a *Streptococcus faecalis* ed a *Streptococcus* sp. del gruppo N di Lancefield, che presenta tuttavia caratteristiche atipiche rispetto alle specie appartenenti a questo gruppo; infine alcuni ceppi risultano ascrivibili ad una stessa specie facente parte del V sottogruppo del gruppo dei Micrococchi.

Nella coltura non è risultato essere presente alcun microorganismo identificabile con la forma microbica isolata da Gustafsson *et al.* [18] e riscontrata attiva dagli autori nella α -deossidrilazione in C₇ dell'acido chenodesossicolico e dell'acido colico; d'altronde anche la nostra coltura mista non si è dimostrata in grado di trasformare l'acido chenodesossicolico.

I numerosi isolamenti effettuati non hanno consentito in queste esperienze di ottenere microrganismi in grado di accumulare singolarmente acido desossicolico da acido colico o da acido 7-chetodesossicolico. Peraltro, per ceppi ascrivibili alla specie *Cl. bifermentans*, sono state rilevate a volte tracce di un metabolita dell'acido colico avente mobilità cromatografica dell'acido desossicolico. Questo sembra riallacciarsi con quanto da noi riscontrato precedentemente per la stessa specie microbica [27].

Dall'insieme dei risultati ottenuti, sia precedentemente che in queste ricerche, si può supporre che più di una forma microbica partecipi all'accumulo di acido desossicolico da acido colico, *in vitro*, nelle colture miste di microrganismi fecali. L'accumulo di questo composto sarebbe condizionato da un determinato rapporto fra le varie forme microbiche presenti. Questo rapporto che nella coltura in esame altamente attiva implica la partecipazione di pochissime specie microbiche, in questo caso permette la completa trasformazione dell'acido colico con la sola produzione di acido desossicolico in notevole quantità.

Sembra a noi che tale risultato ottenuto *in vitro* sia significativo quando si consideri che il processo di deossidrilazione dell'acido colico con accumulo di acido desossicolico, quale avviene nell'intestino dei mammiferi, può essere la conseguenza della partecipazione di più forme microbiche, allorché si verificano determinate condizioni ambientali. Questo ci induce a proseguire le indagini nell'intento di chiarire anche il meccanismo della trasformazione sia utilizzando la coltura mista selezionata che le singole forme microbiche da essa isolate.

Ringrazio l'aiutante di laboratorio del C.N.R. Filippo Bruno per l'attiva collaborazione prestata nell'esecuzione delle ricerche sperimentali.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] R. P. COOK, *Cholesterol*, Academic Press. Inc. Publishers, New York (1958).
- [2] KRITCHEVSKY, *Cholesterol*, J. Wiley e Sons. Inc., New York (1958).
- [3] S. BERGSTRÖM, H. DANIELSSON, B. SAMUELSSON, in *Lipide metabolism*, K. Block edit. John Wiley and Sons, Inc., New York (1960).
- [4] G. A. D. HASLEWOOD, *Bile salts*, Comprehensive Biochemistry, Academic Press, New York (1962).
- [5] S. BERGSTRÖM, H. DANIELSSON in *The Biliary sistem*, edited by W. Taylor; Blaiswell scientific publications, Oxford (1967).
- [6] R. GORDON GOULD, R. P. COOK in *Cholesterol*, edited by Robert P. Cook Academic Press. Inc. Publishers, New York (1958).
- [7] E. E. HAWER, D. K. BIOSHARDT, J. W. HUFF, « J. Nutrition » 72, 379 (1960).
- [8] B. GUSTAFSSON, A. NORMAN, « Proc. Soc. Exp., Biol. Med. » 110, 387 (1962).
- [9] L. SWELL, H. FIELD, C. R. TREADWELL, « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. » 84, 417 (1953).
- [10] L. SWELL, H. FIELD, D. FLICKS, C. R. TREADWELL, « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. » 84, 428 (1953).
- [11] S. GIOVANNETTI, L. GUACCI, P. MAGGIORE, « G. Bioch. », 8, 348 (1959).
- [12] R. R. SCHELIN, « J. Pharmac. Sc. », 57, 2021 (1968).
- [13] D. B. GAWER, in *Comprehensive Biochemistry*, edited by M. Florkin and E. H. Stotz (1968) - vol. 20, chapter II.
- [14] A. NORMAN, S. BERGMAN, « Acta Chem. Scand. », 14, 1781 (1960).
- [15] A. NORMAN, M. SHORB, « Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. », 110, 552 (1962).
- [16] B. SAMUELSSON, « J. Biol. Chem. », 235, 361 (1960).
- [17] O. W. PORTMAN, S. SHAH, A. ANTONIS, B. JORGENSEN, « Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. », 109, 959 (1962).
- [18] B. E. GUSTAFSSON, T. MIDTVEDT, A. NORMAN, « J. Exp. Med. », 123, 413 (1966).
- [19] T. MIDTVEDT, A. NORMAN, « Acta path. microbiol., Scandinav. », 71, 629 (1967).
- [20] T. MIDTVEDT, « Acta path. microbiol. Scandinav. », 71, 147 (1967).
- [21] T. MIDTVEDT, A. NORMAN, « Acta path. microbiol. Scandinav. », 72, 313 (1968).
- [22] T. MIDTVEDT, A. NORMAN; « Acta path. microbiol. Scandinav. », 72, 337 (1968).
- [23] M. J. HILL, B. S. DRASAR, « Biochem. J. » 104, 55 P (1967).
- [24] M. J. HILL, B. S. DRASAR, « J. British Soc. of Gastroenterology-Gut », 92, 82 (1968).
- [25] M. C. COCUCCHI, A. FERRARI, « Rend. Ist. Lomb. Sc. e Lett. », B 97, 255 (1963).
- [26] M. C. COCUCCHI, A. FERRARI, « Rend. Ist. Lomb. Sc. Lett. », B 97, 398 (1963).
- [27] M. C. COCUCCHI, A. FERRARI, « Lincei Rend. Sc. fis. mat. e nat. », 36, 851 (1964).
- [28] M. C. COCUCCHI, A. FERRARI, « Ann. Micr. », 15, 157 (1965).
- [29] S. CARINI, M. C. COCUCCHI, A. FERRARI, « Progr. Biochem. Pharmacol. », 2, 62 (1967).
- [30] A. FERRARI, « Ann. Micr. », 17, 165 (1967).
- [31] P. MARCUS, P. TALALAY, « J. Biol. Chem. », 218, 661 (1956).
- [32] I. POLITI, « Atti VI Congr. Naz. Microbiol. Milano » 751 (1937).
- [33] R. BUTTIAUX, H. BEERENS, A. TACQUET, « Manuel de techniques bactériologiques », Ed. Flammarion, Parigi (1963) pag. 388.
- [34] E. M. BARNES, C. S. IMPEY, H. S. GOLDBERG in *Identification Methods for Microbiologists*. Part. A. Ed. Gibbs B. M. and Skinner F. A. Academic Press London-New York (1966).
- [35] S. J. EDWARDS, « J. Comp. Path. Ther. », 46, 211 (1933).
- [36] E. M. BARNES, « J. Sc. Fd. Agr. », 12, 656 (1959).
- [37] INTERNATIONAL SUBCOMMITTEE ON STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI, « Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon. », 15, 109 (1965).
- [38] A. C. BAIRD-PARKER, « J. Gen. Microbiol. », 30, 409 (1963).
- [39] Y. ABD-EL-MALEK, T. GIBSON, « J. Dairy Res. », 15, 233 (1948).
- [40] P. M. F. SHATTOCH, A. HIRSCH, « J. Path. Bact. », 59, 495 (1947).

- [41] J. NAYLOR, M. E. SHARPE, « J. Dairy Res. », 25, 92 (1958).
- [42] R. HUGH, E. LEIFSON, « J. Bact. », 66, 24 (1953).
- [43] K. SKADHAUGE, *Studies on enterococci with special reference to the serological properties*, Copenhagen: Einar Munksgaards Forlag (1950).
- [44] H. BEERENS, « Ann. Inst. Pasteur », 99, 454 (1954).
- [45] A. T. WILLIS, « Lab. Pract. », 11, 526 (1962).
- [46] V. PUNTONI, *Microbiologia Medica*, ed. Moderna, Roma (1958).
- [47] L. F. FIESER, S. RAJAGOPALAN, « J. Amer. Soc. », 71, 3935 (1949).
- [48] B. SAMUELSSON, « Acta Chem. Scand. », 14, 17 (1960).
- [49] R. S. BREED, E. G. D. MURRAY, A. P. HITCHENS, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1948).
- [50] J. M. SHERMAN, « Bact. Rev. » 1, 3 (1937).
- [51] R. H. DEIBEL, « Bact. Rev. » 28, 330 (1964).
- [52] A. C. BAIRD-PARKER, « J. Gen. Microbiol. » 38, 363 (1965).