

Ricerche sull'azione antibatterica di alcuni aminoacidi

I. Politi - C. Colla - R. Benetti

L'azione antibatterica e sulfamido-potenziatrice degli acidi amino-valerianico e aminocapronico è nota dalle ricerche di Vacirca (1) e di Deotto e Vacirca (2), sebbene non ne sia stato ancora chiarito il meccanismo biochimico. Sta di fatto però che codeste sostanze, pur potendo essere attaccate dai germi per via ossidativa ed utilizzate altresì come fonti di azoto, sono capaci di deprimere fortemente l'ossidazione respiratoria del glucosio e di ostacolare od impedire completamente la moltiplicazione cellulare di taluni schizomiceti.

La singolarità di codeste azioni, esplicate da normali costituenti proteici, come in realtà sono i suddetti aminoacidi, ha indotto ad effettuare alcune indagini di cui si espongono qui i risultati. Si impiegarono germi delle seguenti specie: *B. mesentericus niger* Lünt, *B. prodigiosus*, *Flavobacterium dehydrogenans*, *Corynebacterium mediolanum* e l'acido amino-valerianico posta in commercio dall'Istituto Sieroterapico Milanese sotto il nome di Vazim.

La ricerca venne condotta mediante la tecnica manometrica di Warburg per la determinazione diretta del consumo di ossigeno e con sospensioni batteriche ottenute da piastre di agar comune, filtrate per garza e centrifugate. Per ogni ceppo la respirazione venne controllata comparativamente, in assenza ed in presenza di norvalina (concentrazione in vaschetta corrispondente al 0,83% di Vazim), nei seguenti substrati:

- brodo comune;
- liquido di Sahyun;
- liquido di Sahyun senza solfato ammonico;
- liquido di Sahyun senza glucosio.

Le esperienze vennero predisposte ponendo nella cavità principale della vaschetta cc. 2 di substrato e cc. 0,5 di sospensione batterica; nel pozzetto centrale cc. 0,1 di KOH al 10%; nella appendice laterale cc. 0,5 di soluzione fisiologica o di Vazim al 5%. Temperatura del bagno 30°C. N. 50 oscillazioni complete al minuto.

Dal complesso dei risultati delle determinazioni, riassunti nella tabella I, sono emersi i seguenti rilievi:

— in brodo comune il Vazim esplica una netta azione deprimente sulla respirazione di tutti i quattro ceppi;

— in liquido di Sahyun, ove i ceppi sperimentati, ed in particolare il *Flavobacterium dehydrogenans* ed il *Corynebacterium mediolanum* sono suscettibili di scarsa crescita, si riscontra invece una netta azione deprimente solo per il *B. mesentericus* e per il *C. mediolanum*; scarsa invece è l'azione su *B. prodigiosus*, mentre per il *Fl. dehydrogenans* si ha una respirazione più intensa;

— in liquido di Sahyun senza solfato ammonico si ha un'azione deprimente solo per il *B. mesentericus niger*; per il *C. mediolanum* non si osserva alcuna differenza, mentre per gli altri due germi la respirazione è più intensa in presenza del Vazim;

— in liquido di Sahyun senza glucosio, eccettuato il *C. mediolanum*, la presenza del Vazim intensifica la respirazione.

Dal comportamento in questi due ultimi substrati non emergono sicure indicazioni nei riguardi della capacità dei germi impiegati ad utilizzare l'acido aminovalerianico come substrato respiratorio e come fonte di azoto, tanto più che il Vazim non è un aminoacido allo stato di grande purezza e le influenze constatate potrebbero essere determinate anche dalle impurità del prodotto stesso.

L'influenza dell'acido aminovalerianico è stata successivamente sperimentata, ancora con le modalità sovraesposte, su un ceppo di *Phytomonas tumefaciens*, suscettibile di buon sviluppo pure in liquidi sintetici a base di solo glucosio e sali minerali.

A differenza di quanto era stato constatato per i precedenti microrganismi, l'azione del Vazim è qui risultata come diretta ad intensificare la respirazione, sia in brodo che in liquido di Sahyun.. Codesto inatteso comportamento ha indotto a ripetere l'esperienza con acido aminovalerianico depurato mediante ricristallizzazione. È risultato così che in realtà l'acido aminovalerianico è atto a deprimere nettamente anche l'attività respiratoria del *Phytomonas* e che l'azione stimolante verificatasi nella precedente esperienza era da attribuirsi ad impurità dell'acido greggio impiegato (Tab. II).

Le esperienze di cui sopra vennero integrate da prove colturali le quali dimostrarono chiaramente che l'acido aminovalerianico è atto ad esplicare un'azione batteriostatica, vale a dire inibitrice dei processi moltiplicativi. Ciononostante il meccanismo per cui questo aminoacido agisce come antibiotico sfugge per ora ad una soddisfacente spiegazione. Peraltro venne posto il quesito se tale azione sia specifica di aminoacidi di determinata struttura (ad esempio a catena lunga, come l'aminovalerianico e l'aminocapronico), o se invece non sia una proprietà comune a tutti gli aminoacidi, od a buona parte di essi, e più o meno netta e palese a seconda della natura dei germi, della composizione del substrato e di altre condizioni sperimentali.

Per questa ragione si ritenne interessante sviluppare le ricerche con gli aminoacidi più semplici: glicina, alanina, leucina, saggiate ancora su *Phytomonas tumefaciens*.

L'indagine venne condotta mediante prove di coltura in liquido di Sahyun modificato nei riguardi del componente azotato. Per la glicina venne anche

controllata l'influenza sull'attività respiratoria mediante misure manometriche con l'apparecchio di Warburg.

Con un'esperienza preliminare si poté accertare che in presenza di solfato ammonico, in proporzioni comprese fra il 0,2 ed il 3 per mille di azoto, si ha una crescita praticamente costante.

L'influenza dei singoli aminoacidi venne quindi controllata a dosi variabili sia in assenza che in presenza di solfato ammonico in proporzioni corrispondenti all'1, 2 e 3 per mille di azoto.

Sono così emerse le seguenti constatazioni:

— glicina e leucina vengono utilizzate come fonti di azoto fino ad una certa concentrazione; non utilizzata od utilizzata con una certa difficoltà sembra invece l'alanina;

— oltre una certa concentrazione tutti e tre gli aminoacidi manifestano una palese azione inibente, sia in assenza che in presenza di solfato ammonico, azione che però non è costante, ma varia d'intensità da una prova all'altra, a seconda della quantità di azoto ammoniacale presente nel substrato, della massa microbica di innesto e verosimilmente anche di altre condizioni riflettenti lo stato fisiologico delle cellule. Per questa ragione l'esito di singole prove non può avere che un semplice valore indicativo. Comunque le osservazioni effettuate si possono così riassumere:

— la glicina ha manifestato una palese azione rallentatrice a concentrazioni superiori al 0,1% ed un'azione talvolta completamente inibitrice al 0,15%;

— con l'alanina si ha azione rallentatrice al di sopra del 0,3% ed inibitrice verso od oltre il 0,5%;

— con la leucina l'effetto batteriostatico si manifesta specialmente con un notevole ritardo della crescita già al 0,2%, però una azione decisamente inibitrice si ha solo verso od oltre il 2%.

L'influenza deprimente della glicina sull'attività respiratoria risulta chiaramente dai dati della tab. II.

Il complesso delle ricerche effettuate consente di pervenire alla interessante conclusione che gli aminoacidi in genere o buona parte di essi, indipendentemente dal loro peso molecolare e nonostante la loro eventuale attitudine ad essere utilizzati come fonte di azoto, possono esplicare un'attività antibatterica, deprimente la respirazione ed inibente i processi moltiplicativi, la quale risulterebbe più o meno intensa in dipendenza anche di molteplici condizioni riguardanti sia il substrato culturale, sia le cellule microbiche presenti.

Il meccanismo di tale azione sfugge per ora ad una soddisfacente spiegazione; è però da ritenersi analogo a quello attraverso cui si esplica l'azione rilevata da Niels Nielsen e Vagn Hartelius (3) per taluni fattori auxinici dei lieviti, che pure sono degli aminoacidi (alanina, asparagina, lisina, arginina, ecc.) e che in determinate condizioni possono esplicare un'azione tossica.

RIASSUNTO

Dalle ricerche compiute risulta che non soltanto gli acidi aminovalerianico e aminocaproico, segnalati da altri Autori, sono atti ad esplicare una azione antibatterica deprimente i processi respiratori ed inibente quelli moltiplicativi, ma che anche gli aminoacidi più semplici come la glicina e l'alanina possono agire allo stesso modo. Pertanto si ritiene che tale proprietà sia comune a buona parte degli aminoacidi ed abbia solo a manifestarsi in diversa misura, in dipendenza anche di condizioni relative alla composizione del substrato, alla natura ed allo stato fisiologico dei germi.

SUMMARY

From research carried out it has been proved that not only the aminovalerianic and amino-caproic acids, mentioned by other authors, are suited for the production of an antibacterial action, slowing the respiratory process and preventing that of reproduction, but also simpler aminoacids, glycine, alanine, can produce the same results. Consequently this property is considered as common to the greater number of the aminoacids and appears only to vary in degree, according to the composition of the substratum, the nature and the physiological state of the germs.

BIBLIOGRAFIA

- (1) F. Vacirca: « Boll. I. S. M. », 22, 172, 285, 1943.
- (2) R. Deotto e F. Vacirca: « Boll. I. S. M. », 23, 1944.
- (3) Niels Nielsen e Vagn Hartelius: « Biochem. Zeitschr. » 295, 211, 1938.

Pervenuto in redazione il 15 luglio 1947.

Influenza dell'acido aminovalerianico (Vazir) sulla respirazione di alcuni schizomiceti
Consumi di ossigeno in mmc.

TABELLA I

SUBSTRATO	Corynebacterium mediolanum		Flavobacterium dehydrogenans		B. mesentericus niger		B. prodigiosus	
	60'	120'	60'	120'	60'	120'	60'	120'
Liq. di Sayum	153,6	314,7	53,5	107,7	88,3	226,3	132,1	314,2
Liq. di Sayum + norvalina	143,7	283,4	73,1	135,1	77,4	140,8	155,9	303,8
Liq. di Sayum senza NH ₄	159,0	311,6	41,1	82,2	87,1	187,2	134,6	274,6
Liq. di Sayum + norvalina	155,7	312,2	57,0	116,1	67,5	125,3	161,5	323,7
Liq. di Sayum senza glucosio	10,5	14,0	11,2	19,6	19,2	35,7	9,7	20,2
Liq. di Sayum + norvalina	8,7	12,0	31,9	59,8	24,0	42,9	14,0	28,6
Brodo comune	326,9	630,2	218,9	491,1	241,1	693,5	301,5	583,7
Brodo comune + norvalina	264,9	515,5	188,9	208,6	208,6	570,0	248,5	478,0
Massa microbica (come sostanza sec- ca) mgr.	2,44	1,47	2,3	2,53				

Influenza della norvalina e della glicina sulla respirazione di *Phytomonas tumefaciens*.
Consumi di ossigeno in mmc.

TABELLA II

SUBSTRATO	NORVALINA		GLICINA	
	60'	120'	60'	120'
Soluzione fisiologica	7,0	12,0	4,7	13,3
Liq. di Sayum	120,0	281,0	69,3	163,6
Liq. di Sayum+aminoacido (1)	103,8	203,0	29,0	66,2
Liq. di Sayum senza ammonio	87,7	177,4	66,4	130,7
Liq. di Sayum senza ammonio+aminoacido	103,3	188,8	47,8	93,3

(1) In concentrazione equivalente come azoto al solfato ammonico del liquido di Sayum.