

3. G. PENSO, C. CATTANEO, M. MORELLINI, G. VICARI. — Studi e ricerche sui micobatteri. - XIV. Sul metabolismo del PAS in alcune specie di micobatteri insensibili al PAS.

Riassunto. — Gli AA. mettono in evidenza come alcuni micobatteri — particolarmente il gruppo di quelli che parassitano gli animali a sangue freddo — oltre ad essere insensibili al PAS siano capaci di annerire il terreno contenente il PAS. Gli AA. dimostrano come tali micobatteri attacchino il PAS con una decarbossilasi trasformandolo in metaminofenolo che, ossidandosi, annerisce. Altri micobatteri insensibili al PAS ma che non anneriscono il terreno metabolizzano ugualmente il PAS senza dar luogo, però, a metaminofenolo libero.

Résumé. — Les auteurs mettent en évidence que certaines mycobactéries insensibles au PAS — spécialement le groupe de celles qui sont parasites d'animaux à sang froid — sont capables de noircir le milieu contenant du PAS. Les auteurs démontrent que ces mycobactéries attaquent le PAS par une décarboxylase en le transformant en méthaminophénol qui, en s'oxydant, noircit. D'autres mycobactéries insensibles au PAS, mais qui ne noircissent pas le milieu, métabolisent également le PAS sans donner lieu, cependant, à méthaminophénol libre.

Summary. — The authors point out that some Mycobacteria (particularly those which parasitize cold blooded animals), besides being resistant to PAS, are capable of darkening PAS containing media. The authors demonstrate that these Mycobacteria attack PAS, through a decarboxilase, transforming PAS to metaminophenol which oxidizes and consequently darkens the media. Other Mycobacteria resistant to PAS, but incapable of darkening PAS containing media, metabolize PAS as well without, however, producing free metaminophenol.

Zusammenfassung. — Die Verfasser stellen fest, dass einige Mykobakterien — insbesondere die Gruppe, die sich bei kaltbluetigen Tieren einnistet — nicht nur unempfindlich gegen PAS sind, sondern auch das PAS enthaltende Nährböden schwärzen. Die Verfasser zeigen, dass diese Mykobakterien das PAS mittels Dekarboxylase angreifen und in Metaminphenol umformen, das seinerseits durch Oxydierung schwarz wird. Andere Mykobakterien, die ebenfalls unempfindlich gegen PAS sind,

aber das Nährböden nicht schwärzen, setzen das PAS ebenfalls um, ohne jedoch eine Bildung von freiem Metaminphenol zu verursachen.

Nel 1949 (*Atti Ass. Umbro-Laziale contro la tbc.* Seduta del 3-4-1949) introducemmo nella pratica microbiologica l'uso dei terreni all'acido p-aminosalicilico allo scopo, soprattutto, di differenziare rapidamente i bacilli tubercolari umani e bovini, dagli aviari, e queste due specie da tutti gli altri micobatteri patogeni e non patogeni includibili o meno nel così detto gruppo dei paratubercolari.

Ricorderemo che tale metodo consiste (questi Rendiconti, 13, 390, 1950) nel seminare i micobatteri su terreno di DUBOS contenente quantità scalari di acido p-aminosalicilico e nel constatare se la crescita dei micobatteri in esame venga bloccata da 5 μ g di PAS (tubercolari umani e bovini), da 200 μ g di PAS (tubercolari aviari) o non venga bloccata nemmeno dalla presenza di oltre 1000 μ g di PAS (tutti gli altri micobatteri).

Recentemente avemmo occasione di saggiare con tale metodo un micobatterio di nuovo isolamento — si trattava di un acidoresistente che inquinava una coltura di tubercolare umano —, micobatterio che si mostrò di essere non soltanto perfettamente resistente al PAS ma di dare, in presenza di questo, una colorazione nerastra al terreno in cui cresceva.

Incuriosisti dal fatto, volemmo studiare il fenomeno più da vicino constatando come esso fosse costante e riproducibile a volontà sia sui terreni liquidi che solidi, sia in presenza o in assenza di tween, di verde di malachite, di uovo, di brodo o di agar.

Il germe in questione, seminato su terreno solido adatto per micobatteri (PETRAGNANI, LÖWENSTEIN, HERROLD, agarpatata di PENSO, agar glicerinato semplice, tutti con o senza verde di malachite), dava luogo, ove la semina fosse stata fatta deponendo sul terreno una goccia del materiale, a una grossa colonia liscia (fig. 1 e 3), tondeggiante e apigmentata o, allorchè il materiale veniva strisciato, a una patina sempre liscia e ugualmente apigmentata.

Aggiungendo al terreno impiegato acido p-aminosalicilico nella quantità di 2 $m\mu/cm^3$ si ottenevano colonie o patine analoghe alle precedenti, seppure meno rigogliose, e più pallide, con la particolarità, però, di essere circondate, le colonie, da un alone nerastro (fig. 2 e 4), e le patine da un totale annerimento del terreno.

Tale annerimento si ottiene rapidamente su terreno di HERROLD, più



Fig. 1 - *Mycobacterium minetti* su terreno di Herrold al PAS: colonie di aspetto normale.



Fig. 2 - *Mycobacterium piscium* su terreno di Herrold al PAS: annerimento intorno alle colonie.

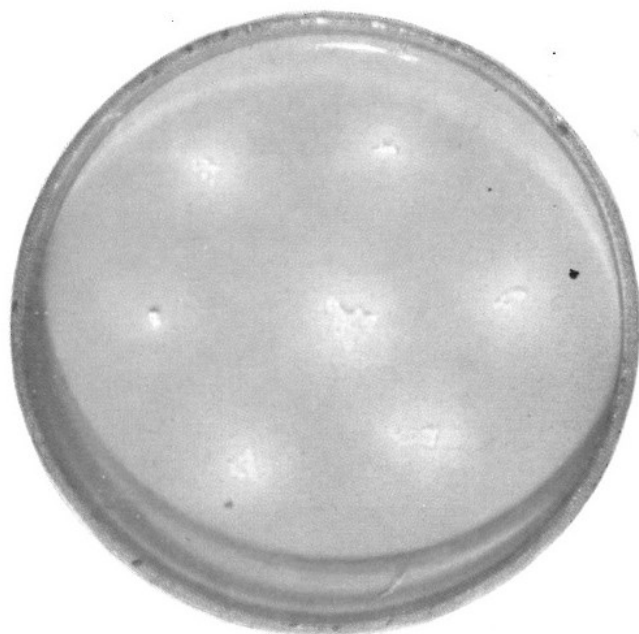


Fig. 3 - *Mycobacterium minetti* su terreno di Herrold al PAS con aggiunta di verde di malachite: colonie di aspetto normale.



Fig. 4 - *Mycobacterium piscium* su terreno di Herrold al PAS con aggiunta di verde di malachite: annerimento intorno alle colonie.

lentamente su agar glicerinato o su terreni contenenti tween 80. I vari terreni differiscono tra loro soltanto per la rapidità con cui il fenomeno si manifesta, essendo l'epifase identica per tutti: nel terreno di HERROLD il fenomeno è visibile, col germe in questione, già dopo 48 ore mentre in presenza di tween il fenomeno è appariscente soltanto in quarta o quinta giornata.

Al suo primo apparire l'alone intorno alla colonia è piuttosto color liquido di LUGOL; col passare del tempo, l'intensità del colore aumenta, la tonalità si scurisce sino ad assumere una tinta nerastra che, in terreno liquido, emana talvolta riflessi metallici.

Abbiamo voluto seguire, su terreno liquido, le curve di annerimento in rapporto con la curva di crescita del germe, ed abbiamo constatato come ci sia soltanto un parziale rapporto tra le due curve in quanto l'annerimento aumenta sì coll'aumentare del numero dei germi, ma prosegue quando i micobatteri hanno raggiunto la fase M (grafico 1). Vedremo più oltre di dare una spiegazione a questo fenomeno.

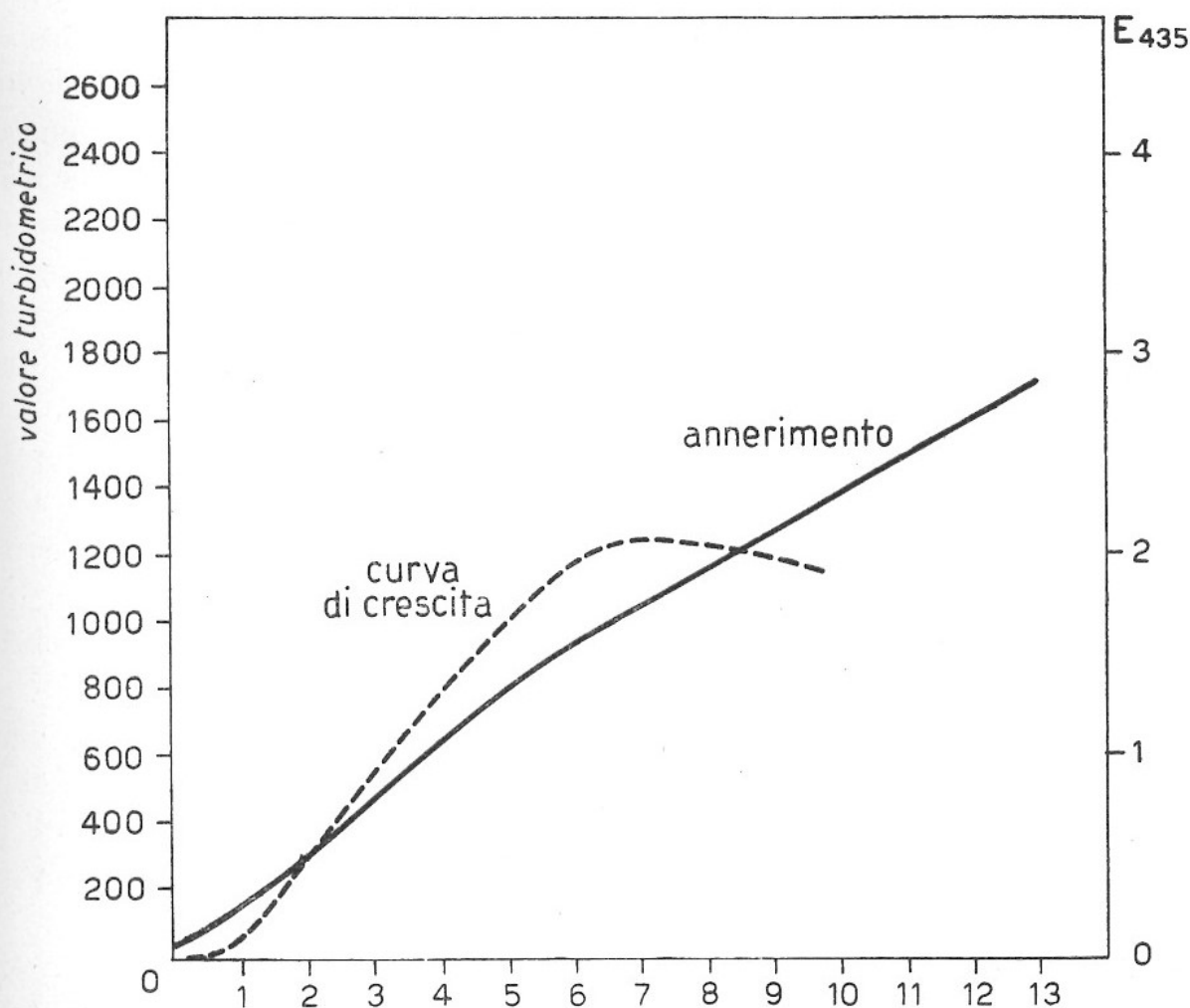


Grafico 1. - Rapporto tra curva di crescita (su terreno al PAS) di un *Mycobacterium piscium* e annerimento del terreno.

Constatato il fatto, sopra il predetto ceppo, abbiamo esteso le nostre ricerche ad altri ceppi per vedere se il fenomeno fosse realizzabile con altri micobatteri di collezione o di nuovo isolamento.

Abbiamo così saggiato 195 ceppi di collezione ottenendo reazione positiva con i seguenti ceppi:

<i>Mycobacterium friedmanni</i>	Ist. R. Koch - Berlino
<i>Mycobacterium piscium</i>	Ist. Pasteur - Parigi
<i>Mycobacterium thamnopheos</i>	Ist. di Microbiologia - Losanna
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Amblyomma	Ist. O. Cruz - Rio de Janeiro
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Eitertupfer	Ist. di Igiene - Zurigo
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Giboia	Ist. O. Cruz - Rio de Janeiro
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Hecke n. 4	Ist. O. Cruz - Rio de Janeiro
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Saenz	Ist. Pasteur - Parigi
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Serpent S. 20	Ist. Pasteur - Parigi
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Terra 73	Ist. di Microbiologia - Losanna
<i>Mycobacterium</i> sp. ceppo Zironi	Ist. di Microbiologia - Milano

La stessa reazione è stata poi saggiata su 355 ceppi da noi isolati ottenendola positiva in 29 ceppi di micobatteri isolati dalla *Musca domestica*; in 13 ceppi isolati da vegetali vari; in 4 ceppi isolati da liquame di fogna; in 11 ceppi isolati dalla terra; in due ceppi isolati dall'aria e in sei ceppi inquinanti colture di tubercolare vero isolato cinque volte da cavie e una volta da topo. In tutto 73 ceppi, che avevano in comune la caratteristica di non essere pigmentati, di non essere patogeni per la cavia e in gran parte isolati da animali a sangue freddo, da insetti o dalla terra, e di avere l'optimum di crescita a temperature ambiente.

Il fenomeno, dunque, non costituiva la particolarità di un determinato stipite, ma la caratteristica di numerosi ceppi che avevano tra loro qualche punto di contatto. Vedremo a tal proposito in prossimi lavori se questa reazione sia una reazione di gruppo o di specie.

Constatato il fenomeno, verificata la sua estensione, abbiamo voluto cercare di individuarne il significato e determinarne la genesi.

Innanzitutto abbiamo voluto vedere se l'annerimento fosse la conseguenza di un'azione diretta del germe o di un'azione operata da enzimi del germe stesso; in altre parole abbiamo voluto vedere se, per aversi lo annerimento, occorresse la presenza del germe o semplicemente di prodotti del suo metabolismo.

A tale scopo abbiamo preso il velo di una vecchia coltura in brodo del germe in esame, l'abbiamo triturato in mortaio con polvere di quarzo, l'abbiamo emulsionato in acqua distillata sterile, abbiamo lasciato sedi-

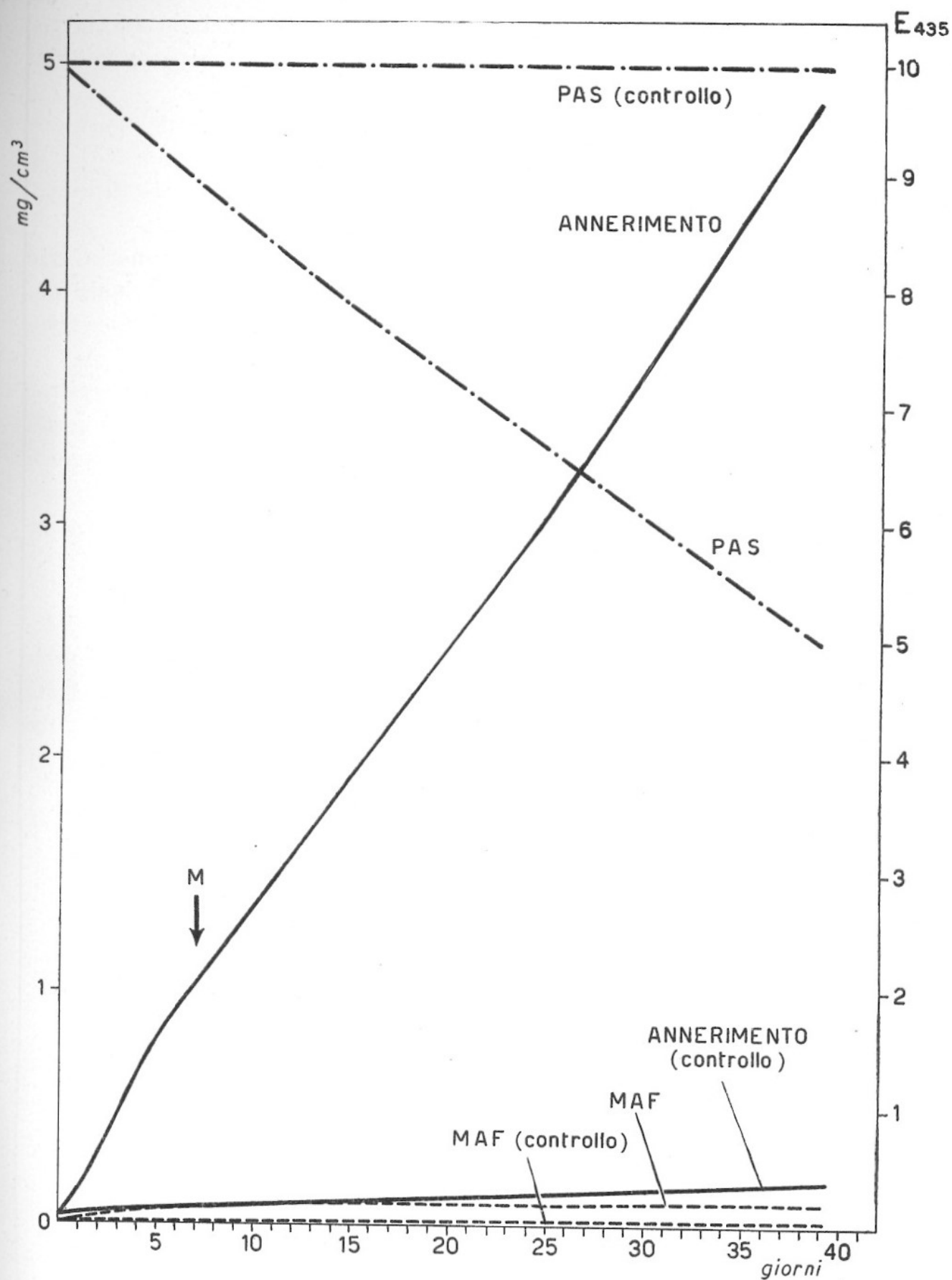


Grafico 2. - Rapporto tra consumo di Pas, annerimento e formazione di MAF da parte di un *Mycobacterium piscium*. Il punto M indica il raggiungimento della fase M nella curva di crescita del germe.

mentare il quarzo e il liquido l'abbiamo filtrato per SEITZ e saggiato su agar al PAS con la tecnica in uso per gli antibiotici — metodo dei microcilindri — constatando come, intorno ad ogni cilindro, si formasse un alone nerastro.

L'annerimento si avverava, dunque, anche in assenza del germe e solo in presenza di prodotti del suo metabolismo.

Riscaldando il liquido a 100°, esso perdeva la sua capacità di annerire il terreno.

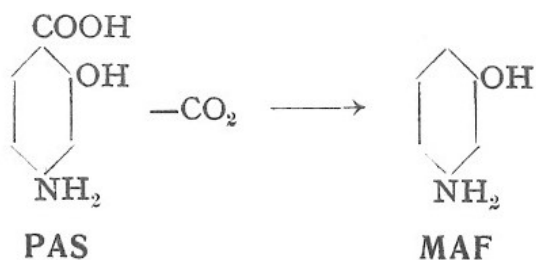
Dall'insieme di queste esperienze risulta evidente che l'annerimento è la conseguenza di una sostanza enzimatica, termolabile, eliminata dal germe, e capace di attaccare il PAS, trasformandolo in un sottoprodotto di colore nerastro.

Questa constatazione ci spiega il fenomeno precedentemente descritto: l'incrementarsi dell'annerimento dopo la fase M; evidentemente i germi o secernono prima della fase M tanto enzima da essere questo capace di agire ancora successivamente al raggiungimento di questa fase, o più probabilmente i germi, durante il periodo di stato, seguitano ancora a secernere enzima, o a riversarne nell'ambiente in conseguenza della loro lisi spontanea.

Convieni ora considerare la natura di questo enzima capace di attaccare il PAS; e che lo attacchi veramente, lo è dimostrato dal fatto che dosando il PAS presente al momento della semina e il PAS presente durante lo sviluppo del germe e successivamente al raggiungimento della fase M, si ha una diminuzione costante che sta in rapporto diretto col progressivo aumentare dell'annerimento (grafico 2).

Il micobatterio è capace, dunque, di attaccare il PAS e trasformarlo chimicamente; ma in che cosa? Conoscendo la labilità dell'acido p-aminosalicilico e la facilità con cui esso perde CO₂, abbiamo pensato subito che il PAS si trasformasse in metaminofenolo. Ed infatti abbiamo constatato come fosse presente un piccolo quantitativo di metaminofenolo, quantitativo che aumentava progressivamente sino alla fine dell'osservazione durata 40 giorni.

Evidentemente il nostro gruppo di micobatteri deve possedere una decarbossilasi capace di attaccare il PAS e trasformarlo in metaminofenolo secondo il seguente meccanismo:



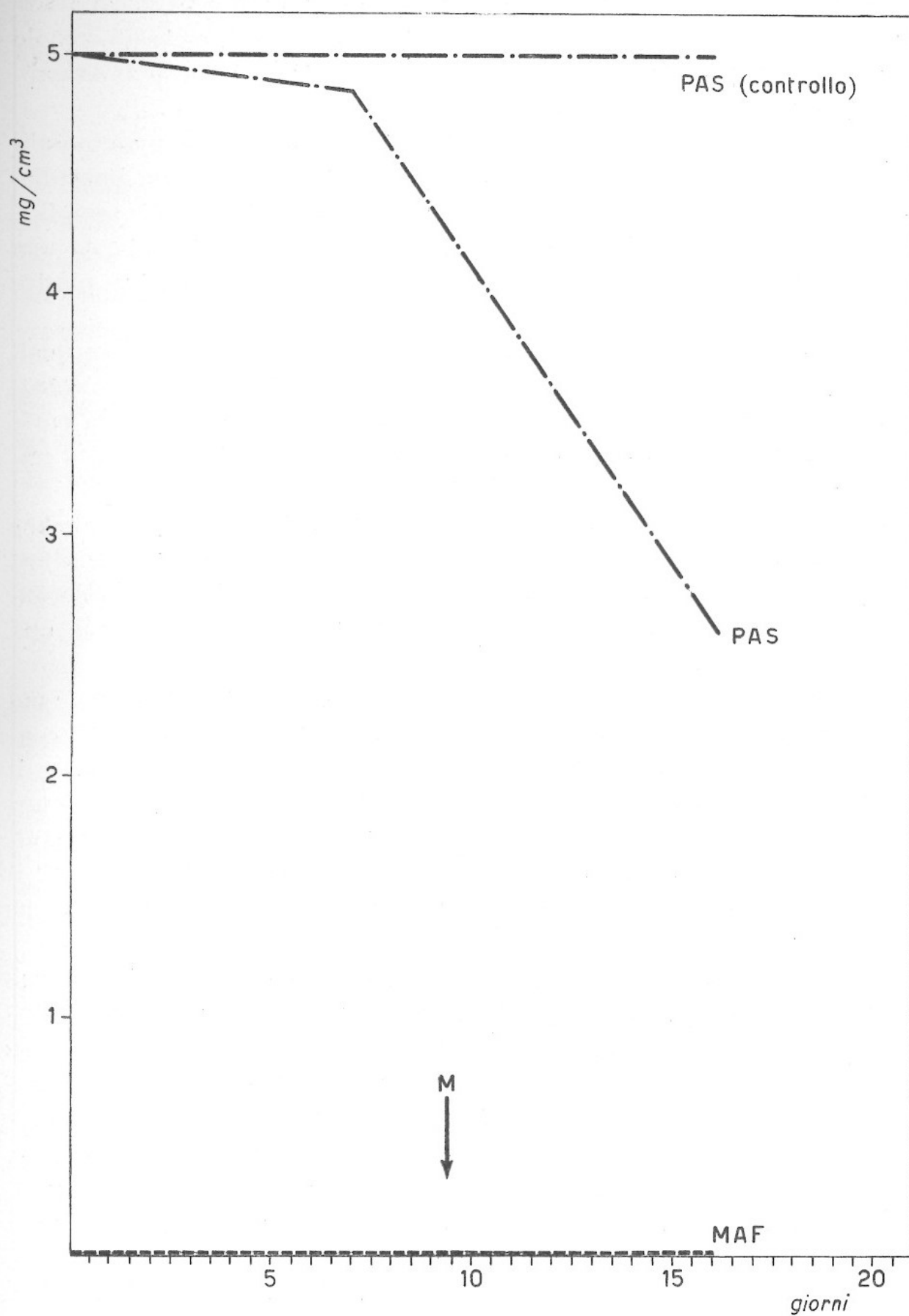


Grafico 3. - Consumo di PAS da parte di un micobatterio insensibile al PAS ma non annerente, *Mycobacterium minetti*. Il punto M indica il raggiungimento della fase M nella curva di crescita del germe.

D'altro canto, però, il metaminofenolo non è nero e lo diventa soltanto in seguito a ossidazione, mentre la quantità di metaminofenolo dosato all'analisi non è in rapporto con la quantità di acido p-aminosalicilico demolito.

Evidentemente gli enzimi che decarbossilano l'acido p-aminosalicilico trasformano questo in metaminofenolo che deve venire immediatamente attaccato da altri enzimi e degradato in sostanze più semplici. Ne deve, però, rimanere libera una piccola parte che, attaccata da una ossidasi, dà luogo al prodotto nerastro rivelabile sulle nostre piastre anche ad occhio nudo.

La messa in evidenza di un simile fenomeno può chiarirci in qualche maniera il meccanismo della spontanea resistenza di alcuni micobatteri al PAS. Tale resistenza potrebbe essere dovuta alla capacità, da parte dei micobatteri, di attaccare attivamente con i loro enzimi il PAS e trasformarlo in derivati innocui.

Ove questa ipotesi fosse attendibile, un fenomeno analogo dovrebbe riscontrarsi nei micobatteri insensibili al PAS ma non annerenti i terreni al PAS. Ci dicemmo: potrebbe darsi esistano micobatteri provvisti di una decarbossilasi che trasformi il PAS in MAF ma sprovvisti di una ossidasi capace di annerire il MAF.

Ripetemmo così la nostra esperienza con ceppi resistenti al PAS ma privi della capacità di annerire i terreni contenenti questo acido. E constatammo così come anche questi ceppi fossero capaci di trasformare il PAS in altre sostanze, e ciò perchè la quantità di PAS presente nel terreno di coltura diminuiva col progredire della coltura (grafico 3) e seguiva a diminuire anche dopo che i germi avevano raggiunto la fase M, il che, in un certo qual modo, stava a dimostrare che il fenomeno, anche in questo caso, era di natura enzimatica.

In questo secondo gruppo di micobatteri, però, non si è potuto mettere in evidenza la contemporanea formazione di metaminofenolo, il che può farci sospettare che l'eventuale formazione di questo sia immediatamente seguita da una sua successiva degradazione, o che gli enzimi di questo secondo gruppo di micobatteri attacchino diversamente il PAS.

Le presenti ricerche, se da un lato possono in qualche modo chiarire il meccanismo della insensibilità al PAS da parte di alcuni micobatteri, dall'altra aprono la possibilità di discernere, nel folto gruppo dei micobatteri specificamente indistinti, un gruppo o una specie biochimicamente rivelabile. E di ciò tratteremo in un nostro prossimo lavoro.