

30. M. PRINCIVALLE e Littoria von LORCH. — Sintesi di alcune vitamine del gruppo B da parte di ceppi batterici artificialmente resi antibiotico-resistenti.

Riassunto. — Gli Autori hanno preso in considerazione il potere di sintesi di alcune vitamine del gruppo B (vitamina B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP, acido folico, acido pantotenico) da parte di alcuni ceppi batterici (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis*), resi artificialmente resistenti agli antibiotici più comunemente usati.

I risultati ottenuti indicano che l'induzione di resistenza agli antibiotici non apporta variazioni notevoli della proprietà vitamino-sintetica dimostrata dai ceppi originari non antibiotico-resistenti.

Résumé. — Les auteurs ont étudié le pouvoir de synthèse de quelques souches bactériques (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis*) sur quelques vitamines du groupe B (vitamine B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP, acide pantothenique, acide folique). Ces souches avaient été rendues résistantes aux antibiotiques plus utilisés.

Les résultats obtenus montrent que l'induction de la résistance aux antibiotiques n'apporte pas des variations remarquables à la propriété de synthèse des vitamines constatée chez les souches originaires qui n'étaient pas résistantes aux antibiotiques.

Summary. — The authors have studied the ability of strains of bacteria (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis*) which were artificially resistant to the most commonly used antibiotics, to synthesis several of the B vitamins (B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP., folic acid, pantothenic acid). The results indicate that the induction of antibiotic-resistance in a strain does not significantly alter the vitamin synthesizing ability from that of the parent strain.

Zusammenfassung. — Die Autoren haben die Machtsynthese einiger Vitamine der Gruppe B in Erwägung gezogen (Vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP, Folsäure, Phantothensäure) seitens einiger Bakterienstämme (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis*) die künstlich den Antibiotica, die am häufigsten gebraucht werden, widerstandsfähig gemacht wurden.

Die erhaltenen Resultate zeigen, dass der Induktionswiderstand der Antibiotica keine bemerkenswerte Variationen an der Eigenschaft des

synthetischen Vitamins verursacht, welches durch die Originalstämme die den Antibiotica nicht widerstandsfähig sind gezeigt wurde.

La scoperta degli antibiotici e la loro conseguente applicazione nella terapia antinfettiva, ha sostanzialmente modificato il quadro clinico di tutte le malattie sensibili al trattamento antibiotico.

A queste modificazioni dei quadri clinici contribuiscono fattori di varia natura; uno dei preminenti è legato alle alterazioni che gli antibiotici inducono nella flora microbica intestinale, cioè il « dismicrobismo intestinale ». [GIUNCHI ⁽¹⁾; SCURO ⁽²⁾; APPELBAUM ⁽³⁾; BARACH ⁽⁴⁾; SOMMER ⁽⁵⁾; STANLEY ⁽⁶⁾; WAISBREIN ⁽⁷⁾; WHEAT ⁽⁸⁾; JOW ⁽⁹⁾].

Con l'eliminazione mediante sostanze antibatteriche della flora intestinale vengono a mancare i benefici che da essa trae l'organismo ospite; infatti al « dismicrobismo intestinale » sono legati alcuni effetti secondari e, particolarmente, l'avitaminosi dei fattori del gruppo B.

L'avitaminosi B, per abolizione della flora intestinale [BEDFORD ⁽¹⁰⁾; ELLINGER ⁽¹¹⁾; WOLFBON ⁽¹²⁾; WOODS ⁽¹³⁾; HARRIS ⁽¹⁴⁾; BASSI ⁽¹⁵⁾; CHINI ⁽¹⁶⁾; MELLI ⁽¹⁷⁾; TRONCHETTI ⁽¹⁸⁾; BAJEUX ⁽¹⁹⁾; CHENNIG ⁽²⁰⁾; HARRIS ⁽²¹⁾; LENNETTE ⁽²²⁾; MANHEIM ⁽²³⁾; O'LEARY ⁽²⁴⁾; SCHOEDER ⁽²⁵⁾; WILCOX ⁽²⁶⁾], è stata largamente accertata su numerose specie animali ed è noto che per ottenere sperimentalmente sindromi carenziali di alcune vitamine è necessario eliminare negli animali la flora batterica, capace di sintetizzare la vitamina o le vitamine corrispondenti, mediante sulfamidici o antibiotici.

Anche nell'uomo è stato dimostrato che una parte del fabbisogno in vitamine è di provenienza batterica intestinale (« quota vitaminica endogena ») [PETERSON ⁽²⁷⁾; ELVEHJEM ⁽²⁸⁾; JOHANSSON ⁽²⁹⁾; ELVEHJEM ⁽³⁰⁾; LEFEBURES-BOISSELOT ⁽³¹⁾; CIMINO ⁽³²⁾; DAFT ⁽³³⁾; KNIGHT ⁽³⁴⁾].

Recentemente si è tentato, in corso di trattamento con antibiotici, di somministrare colture di microrganismi resi artificialmente resistenti agli antibiotici (*Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis*); tali germi avrebbero il compito di reintegrare la flora intestinale distrutta e, in particolare, di sopperire alla quota endogena vitaminica carenziata.

In un lavoro svolto da alcuni di noi [NEGRI ⁽³⁵⁾] è stata indagata la possibilità d'impianto intestinale di alcuni ceppi batterici antibiotico-resistenti.

I risultati di tale ricerca confermano la possibilità d'impianto intestinale di questi microrganismi in animali (cane), dopo somministrazione orale delle colture.

Scopo del presente lavoro è stato di accertare se i ceppi resi artificialmente resistenti agli antibiotici possono agire quali reintegratori della quota B-vitaminica endogena, conservando intatta la loro capacità di sintetizzare le vitamine del gruppo B; abbiamo inoltre confrontato tale capacità con quella mostrata dai ceppi originari non antibiotico-resistenti. E' noto, infatti, che le colture resistenti ottenute per selezione presentano spesso caratteri di varia natura per cui si differenziano dal ceppo originario.

Tali caratteri possono riguardare la morfologia [Mc MURTRIE (³⁶); VON LORCH (³⁷)], la biochimica [MIKA (³⁸)], la struttura antigene [CASSATA (³⁹)], la virulenza [ROSA (⁴⁰)], nonché modificazioni dell'attività sintetica nei riguardi dei fattori di crescita [PETERSON (⁴¹); WYSS (⁴²)].

MATERIALI E TECNICA.

Sono stati presi in considerazione i seguenti ceppi batterici:

Lactobacillus acidophilus (220) e le sue mutanti resistenti a: penicillina, streptomina, tetraciclina, cloranfenicolo.

Lactobacillus bifidus (N.C.I.B. 2797) e le sue mutanti resistenti a: penicillina, streptomina, tetraciclina, cloranfenicolo.

Streptococcus lactis (25) e le sue mutanti resistenti a: penicillina, streptomina, tetraciclina, cloranfenicolo.

Bacillus subtilis (A.T.C.C. 9799) e le sue mutanti resistenti a: penicillina, streptomina, tetraciclina, cloranfenicolo, bacitracina, tirotricina.

Il terreno colturale impiegato per il graduale adattamento dei ceppi batterici all'antibiotico, verso il quale si desiderava ottenere la resistenza, è stato l'agar carota fegato [VON LORCH (⁴³)]. Tale terreno colturale era aggiunto di antibiotico. Il terreno di conservazione per i ceppi batterici è l'agar carota fegato, aggiunto di latte nel caso dei lattobacilli, e di antibiotico per le mutanti antibiotico-resistenti [VON LORCH (⁴⁴)].

Il grado di resistenza agli antibiotici posseduto dai ceppi antibiotico-resistenti in esame è del seguente ordine:

Penicillina 10 U/cm³

Streptomina 1.000 γ /cm³

Tetraciclina 100 γ /cm³

Cloranfenicolo 100 γ /cm³

Bacitracina 50 U/cm³

Tirotricina 100 γ /cm³

E' stato preso in considerazione il potere di sintesi di tutti i ceppi sopra elencati nei confronti delle seguenti vitamine: B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP, acido folico, acido pantotenico.

I terreni e ceppi batterici impiegati per la titolazione delle vitamine sono stati i seguenti:

Vitamina B₁ - Terreno di prova: Thiamine assay medium Difco (B326)
Germe titolatore: *Lactobacillus fermentum* 36 A.T.C.C. 9833;

Vitamina B₂ - Terreno di prova: Riboflavin assay medium Difco (B325)
Germe titolatore: *Lactobacillus casei* E A.T.C.C. 7496;

Vitamina B₆ - Terreno di prova: Pyridoxine assay medium Difco (B324)
Germe titolatore: *Neurospora sitophila* 299 A.T.C.C. 9276;

Vitamina B₁₂ - Terreno di prova: B₁₂ assay medium USP Difco (B457)
Germe titolatore: *Lactobacillus leichmannii* A.T.C.C. 7830;

Vitamina PP - Terreno di prova: Niacin assay medium Difco (B322)
Germe titolatore: *Lactobacillus arabinosus* 17-5 A.T.C.C. 8014;

Acido folico - Terreno di prova: Folic acid assay medium Difco (B318)
Germe titolatore: *Streptococcus lactis* R A.T.C.C. 8043;

Acido pantotenico - Terreno di prova: Pantothenate assay medium Difco (B323)
Germe titolatore: *Lactobacillus arabinosus* 17-4 A.T.C.C. 8014.

I ceppi di cui si voleva valutare il potere di B-vitamina-sintesi sono stati coltivati su di un terreno così composto:

Glucosio	g	15
Caseina idrolizzata con acidi esente da vitamine	g	10
Acido citrico	g	2
Fosfato di potassio bibasico,	g	0,5
Solfato di magnesio	g	0,5
Acqua distillata	cm ³	1.000
(pH 6,8 dopo sterilizzazione)		

In questo terreno è stata ottenuta una crescita di circa 10^{10} cellule/cm³ per il *Bacillus subtilis*, e sue mutanti, dopo 24 ore di incubazione a 37°C. e per i lattobacilli dopo 48 ore.

A crescita avvenuta sono state allontanate le cellule batteriche dal liquido colturale mediante filtrazione per filtro Seitz, onde ottenere un liquido chiaro che non interferisse sulle letture nefelometriche. Con le tecniche usuali sono quindi state determinate le concentrazioni delle varie vitamine presenti nei filtrati.

Riassumiamo nella tabella i risultati ottenuti.

Ceppi batterici	Vit. B ₁ γ/cm ³ coltura	Vit. B ₂ γ/cm ³ coltura	Vit. B ₆ γ/cm ³ coltura	Vit. B ₁₂ mγ/cm ³ coltura	Vit. PP γ/cm ³ coltura	Ac. folico γ/cm ³ coltura	Acido pantoten. γ/cm ³ coltura
<i>L. acidophilus</i>	0,007	0,025	0,010	0,040	0,001	0,010	0,050
<i>L. acidophilus</i> R1	0,006	0,025	0,008	0,050	0,001	0,002	0,040
<i>L. acidophilus</i> R2	0,005	0,020	0,010	0,030	0,001	0,004	0,050
<i>L. acidophilus</i> R3	0,008	0,015	0,012	0,060	0,001	0,006	0,060
<i>L. acidophilus</i> R4	0,005	0,020	0,008	0,025	0,001	0,010	0,0 0
<i>L. bifidus</i>	0,012	0,030	0,012	0,120	0,010	0,008	0,080
<i>L. bifidus</i> R1	0,010	0,030	0,010	0,120	0,002	0,004	0,070
<i>L. bifidus</i> R2	0,010	0,025	0,008	0,080	0,008	0,008	0,050
<i>L. bifidus</i> R3	0,008	0,020	0,008	0,150	0,006	0,006	0,060
<i>L. bifidus</i> R4	0,010	0,030	0,006	0,150	0,002	0,006	0,080
<i>Strep. lactis</i>	0,010	0,020	0,004	0,030	0,002	0,008	0,100
<i>Strep. lactis</i> R1	0,012	0,020	0,003	0,050	0,001	0,004	0,120
<i>Strep. lactis</i> R2	0,008	0,015	0,005	0,040	0,001	0,005	0,080
<i>Strep. lactis</i> R3	0,010	0,015	0,006	0,030	0,0015	0,002	0,060
<i>Strep. lactis</i> R4	0,007	0,015	0,008	0,060	0,002	0,006	0,100
<i>B. subtilis</i>	0,015	0,035	0,015	1,600	0,020	0,012	0,040
<i>B. subtilis</i> R1	0,012	0,030	0,012	0,800	0,015	0,002	0,020
<i>B. subtilis</i> R2	0,012	0,030	0,010	1,000	0,008	0,004	0,0 0
<i>B. subtilis</i> R3	0,015	0,020	0,012	1,000	0,010	0,006	0,060
<i>B. subtilis</i> R4	0,015	0,025	0,010	1,800	0,010	0,008	0,050
<i>B. subtilis</i> R5	0,012	0,025	0,006	1,200	0,010	0,008	0,040
<i>B. subtilis</i> R6	0,010	0,030	0,008	0,400	0,006	0,004	0,020

R1 = mutante resistente alla penicillina (40 U/cm³); R2 = mutante resistente alla streptomina (1.000 γ/cm³); R3 = mutante resistente alle tetraciline (100 γ/cm³); R4 = mutante resistente al cloranfenicolo (100 γ/cm³); R5 = mutante resistente alla bacitracina (50 U/cm³); R6 = mutante resistente alla tirotricina (100 γ/cm³).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.

I risultati riportati nella tabella dimostrano che la capacità di sintetizzare alcune vitamine del gruppo B da parte dei ceppi batterici considerati (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus*

lactis, *Bacillus subtilis*) resta pressochè invariata quando nei ceppi stessi viene indotta la resistenza agli antibiotici; pertanto queste mutanti antibiotico-resistenti, oltre che reintegrare la microflora intestinale, possono assumere la funzione di fornire, almeno in parte, la quota B-vitaminica endogena, dato che sono dotati di proprietà vitamino-sintetiche.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) GIUNCHI G., SORICE F. - « Policlinico » Sez. Prat., 61: 477 (1954).
- (2) SCURO L. A. - Collana di monografie ESI, Napoli, 1955.
- (3) APPELBAUM E., LEFF W. - J.A.M.A., 138: 119 (1948).
- (4) BARACH A. L. e coll. - Arch. Int. Med., 90: 808 (1952).
- (5) SOMMER L. S. e coll. - Am. J. Med., 7: 511 (1949).
- (6) STANLEY M. M. - Am. J. Med., 2: 253 e 347 (1947).
- (7) WAISBREIN B. A. - Arch. Int. Med., 88: 467 (1951).
- (8) WHEAT R. P. - Arch. Int. Med., 88: 461 (1951).
- (9) JOW E. M. - J.A.M.A., 149: 1184 (1952).
- (10) BEDFORD P. D. - Brit. Med. J., 2: 63 (1946).
- (11) ELLINGER P. e coll. - Brit. Med. J., 2: 611 (1946).
- (12) WOLFSON S. A. - J.A.M.A., 140: 1206 (1949).
- (13) WOODS J. W. e coll. - J.A.M.A., 145: 207 (1951).
- (14) HARRIS H. - Scope, 3: 7 (1950).
- (15) BASSI G. - Inter. Wschr. Vitamin., 20: 444 (1948).
- (16) CHINI V. - Rass. Clin. Scient., 23: 67 (1947).
- (17) MELLI B., MAGRI G. - Arcisp. S. Anna Ferrara, 1: 35 (1948).
- (18) TRONCHETTI F., FIASCHI E. - Rass. Fisiopatol. Clin. Ter., 21: 459 (1949).
- (19) BAJEUX A. - Presse Méd., 59: 1828 (1951).
- (20) CHENNIG C. C. - J.A.M.A., 146: 767 (1951).
- (21) HARRIS H. - J.A.M.A., 142: 161 (1950).
- (22) LENNETTE E. H. e coll. - Ann. New York Acad. Sc., 51: 331 (1948).
- (23) MANHEIM S. D. - cit. Presse Méd., 60: 853 (1952).
- (24) O'LEARY P. A. e coll. - Proc. Staff. Meet. Mayo Clin., 23: 574 (1948).
- (25) SCHROEDER H. - Munch. Med. Wschr., 93: 2525 (1941).
- (26) WILLCOX R. R. - Lancet, 2: 114 e 154 (1951).
- (27) PETERSON W. H., PETERSON M. S. - Bact. Rev., 9: 49 (1945).
- (28) ELVEHJEM C. A. - J.A.M.A., 135: 379 (1947); 136: 913 (1948); 137: 916 (1948); Feder. Proc., 7: 410 (1948).
- (29) JOHANSSON K. R. e coll. - Bact. Rev., 13: 25 (1949).
- (30) ELVEHJEM C. A. - J. Am. Dietet. Ass., 22: 959 (1946).
- (31) LEFEBURES-BOISSELOT J. - Ann. Nutrit. Alim., 6: 5 (1952).
- (32) CIMINO G., BERNARDINI A. - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 28: 856 (1952).
- (33) DAFT F. S. e coll. - Vitamins and hormones, 3: 49 (1945).
- (34) KNIGHT B. C. - Vitamins and hormones, 3: 105 (1945).
- (35) NEGRI R. e coll. - Attualità Medica, XXII/8 (Agosto 1957).
- (36) MC MURTRIE E., BERMAN D. T. - Bact. Proc., 47 (1953).
- (37) VON LORCH e coll. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 21: 174 (1958).
- (38) MIKA e coll. - J. Bact., 68: 562 (1954).
- (39) CASSATA F., FONTI E. - Riv. Ist. Sierot. Mil., 28: 336 (1953).
- (40) ROSA A. e coll. - Nuovi Ann. Ig. Micr., 4: 277 (1953).
- (41) PETERSON A., POPE H. - J. Bact., 64: 25 (1952).
- (42) WYSS O., SCHAIBERGER G. E. - J. Bact., 66: 49 (1953).
- (43) VON LORCH L., NEGRI R. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 18: 36 (1955).
- (44) VON LORCH L. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 19: 598 (1956).