

68. A. GAUDIANO, M. PRINCIVALLE, A. ZAMPIERI. — Azione della tiamina e di suoi derivati su alcuni microrganismi.

Riassunto. — Viene studiata l'azione della tiamina e di alcuni suoi derivati (esteri mono- e pirofosforico, clorotiamina, acetiltiamina, ossitiamina, piritiamina, residui pirimidinico e tiazolico della tiamina) su cinque ceppi (due penicilli, due aspergilli, un micobatterio) che richiedono la tiamina come fattore di crescita.

La crescita degli aspergilli viene stimolata dalla tiamina e suoi esterifosforici, dall'ossitiamina, e, in minor misura, dalla clorotiamina e dall'acetiltiamina; viene inibita dalla piritiamina, non viene influenzata dai residui pirimidinico e tiazolico.

La crescita dei penicilli viene stimolata dalla tiamina e suoi esterifosforici e, in minor misura, dalla clorotiamina e dall'acetiltiamina; viene inibita dalla piritiamina e dall'ossitiamina; non viene influenzata dai residui pirimidinico e tiazolico.

La crescita del *Myc. sp.* ceppo Pellegrino viene stimolata dalla tiamina e suoi esterifosforici, dalla clorotiamina, dall'acetiltiamina, dalla piritiamina e dal residuo pirimidinico; non viene influenzata dall'ossitiamina e dal residuo tiazolico.

Résumé. — Les Auteurs ont étudié l'action de la thiamine et de quelques uns de ses dérivés (esters mono- et pyrophosphorique, chlorothiamine, acétylthiamine, oxythiamine, pyrithiamine, résidus pyrimidinique et thiazolique de la thiamine) sur cinq souches (deux pénicilles, deux aspergilles, une mycobactérie) qui exigent la thiamine comme facteur de croissance.

La croissance des aspergilles est stimulée par la thiamine et par ses esters phosphoriques, par l'oxythiamine et, en plus petite mesure, par la chlorothiamine et par l'acétylthiamine; elle est inhibée par la pyrithiamine, elle n'est pas influencée par les résidus pyrimidinique et thiazolique.

La croissance des pénicilles est stimulée par la thiamine et par ses esters phosphoriques et, en plus petite mesure, par la chlorothiamine et par l'acétylthiamine; elle est inhibée par la pyrithiamine et par l'oxythiamine; elle n'est pas influencée par les résidus pyrimidinique et thiazolique.

La croissance de la *Myc. sp.* Pellegrino est stimulée par la thiamine et par ses esters phosphoriques, par la chlorothiamine, par l'acétylthia-

mine et par le résidu pyrimidinique; elle n'est pas influencée par l'oxythiamine et par le résidu thiazolique.

Summary. — The action of thiamine and some of its derivatives (mono- and pyrophosphoric esters, chlorothiamine, acetylthiamine, hydroxythiamine, pyriethiamine and the pyrimidine and thiazole residues of thiamine) was studied on five strains (two penicillia, two aspergilli, and a mycobacterium) which required thiamine as a growth factor.

The growth of the aspergilli was stimulated by thiamine and its phosphoric esters, by hydroxythiamine and to a slight extent by chlorothiamine and acetylthiamine; it was inhibited by pyriethiamine and not affected by the pyrimidine or thiazole residues.

The growth of the penicillia was stimulated by thiamine and its phosphoric esters and to a slight extent by chlorothiamine and acetylthiamine; it was inhibited by pyriethiamine and hydroxythiamine and was not affected by the pyrimidine or thiazole residues.

The growth of *Myc. sp.* Pellegrino strain, was stimulated by thiamine and its phosphoric esters, by chlorothiamine, acetylthiamine, pyriethiamine and the pyrimidine residue. It was not affected by hydroxythiamine or the thiazole residue.

Zusammenfassung. — Die Wirkung des Thiamins und einiger seiner Derivate (Mono- und Pyrophosphorsäureester, Chlorthiamin, Azethylthiamin, Oxythiamin, Pyriethiamin, pyrimidinische und thiazolische Reste des Thiamins) auf 5 verschiedene Stämme (2 Penicillia, 2 Aspergilli, 1 Mycobacterium), welche das Thiamin als Wachstumsfaktor verlangen, wird studiert.

Das Wachstum der Aspergillusstämme wird vom Thiamin und seinen Phosphorsäureestern, vom Oxythiamin und in geringerem Ausmass von Chlorthiamin und Azethylthiamin gefördert; es wird hingegen vom Pyriethiamin gehindert während es von den pyrimidinischen und den thiazolischen Resten nicht beeinflusst wird.

Das Wachstum der Penicilliumstämme wird vom Thiamin und seinen Phosphorsäureestern und in geringerem Ausmass vom Chlorthiamin und vom Azethylthiamin gefördert; es wird hingegen von Pyriethiamin und vom Oxythiamin gehindert, während es von den pyrimidinischen und den thiazolischen Resten nicht beeinflusst wird.

Das Wachstum des Mycobacterium Stamm Pellegrino wird vom Thiamin und seinen Phosphorsäureestern, vom Chlorthiamin, vom

Azethylthiamin, vom Pyrithiamin und vom pyrimidinischen Rest gefördert, während es vom Oxythiamin und vom Thiazolrest nicht beeinflusst wird.

Nell'ambito di alcune nostre ricerche sui sistemi enzimatici dei microrganismi, abbiamo voluto studiare l'azione della tiamina e di alcuni suoi derivati su cinque microrganismi: due aspergilli, due penicilli e un micobatterio.

E' noto che tutti i microrganismi abbisognano della tiamina come fattore di crescita; ma, mentre alcuni di essi sono autotrofi rispetto a questa vitamina, altri sono eterotrofi; altri, infine, mostrano un comportamento intermedio, in quanto sono capaci di sintetizzarla dai suoi residui, pirimidinico e tiazolico, qualora entrambi o uno dei due siano presenti nel terreno di coltura. Queste differenze di comportamento sono, evidentemente, in relazione con la presenza, nei diversi microrganismi, di enzimi diversi.

E' noto anche che la tiamina agisce generalmente sotto forma di estere pirofosforico, la cocarbossilasi; da vari indizi appare però che questo non è il suo unico modo d'azione.

PARTE SPERIMENTALE

MICROORGANISMI.

Sono stati studiati i seguenti ceppi:

- 1) *Aspergillus* 7
- 2) *Aspergillus* 11
- 3) *Penicillium* 152
- 4) *Penicillium* 154
- 5) *Mycobacterium* sp. ceppo Pellegrino.

Gli aspergilli erano mutanti esigenti tiamina ottenuti per irradiazione con raggi ultravioletti da *Aspergillus nidulans*. Il ceppo originale è autotrofo rispetto alla tiamina (¹).

I penicilli, analogamente, erano mutanti esigenti tiamina ottenuti per irradiazione ultravioletta di *Penicillium chrysogenum*.

Il *Mycobacterium* sp. ceppo Pellegrino era già stato parzialmente studiato da LUTZ (2).

Siccome i due ceppi di *Aspergillus* e i due di *Penicillium* non hanno mostrato sensibili differenze nel loro comportamento rispetto alla tiamina e agli altri composti provati, parleremo, in seguito, di *Aspergillus* e *Penicillium*, senza ulteriori specificazioni.

TERRENI.

Le nostre prove sono state eseguite su terreni sintetici resi solidi mediante l'aggiunta dell'1,8% di agar. Abbiamo preferito l'uso di terreni solidi perchè consentivano una migliore valutazione delle differen-

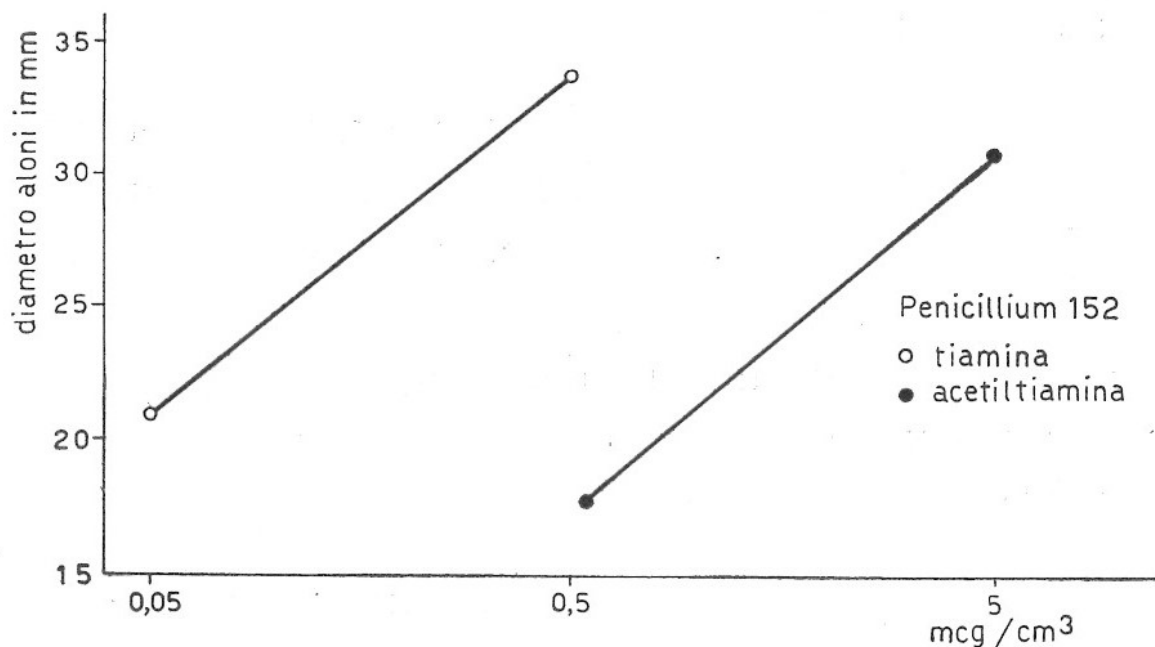
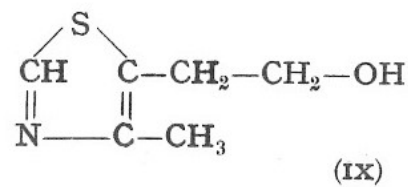
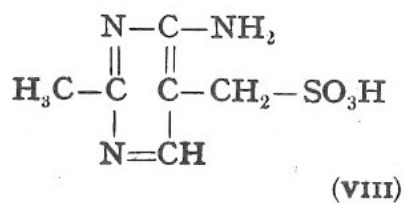
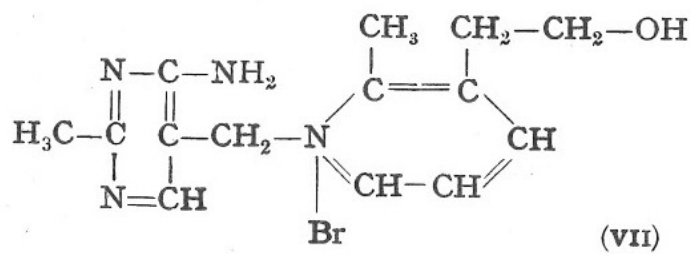
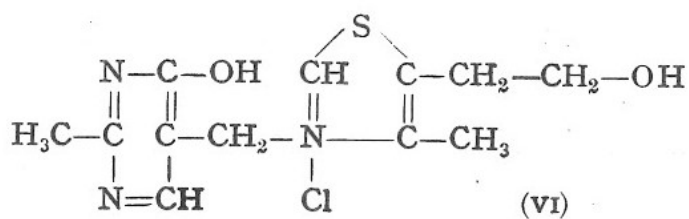
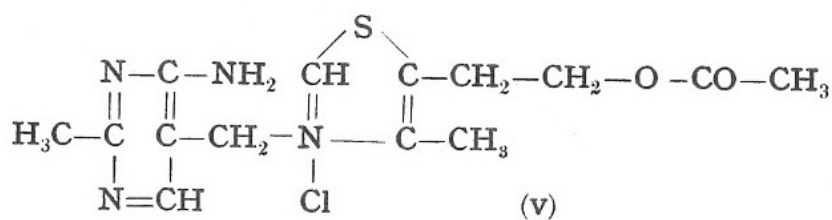
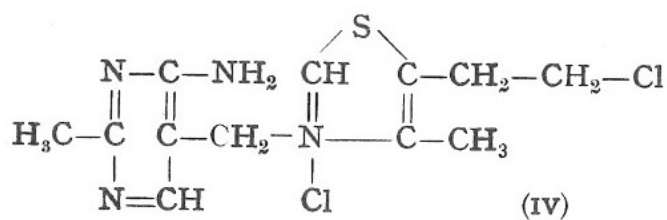
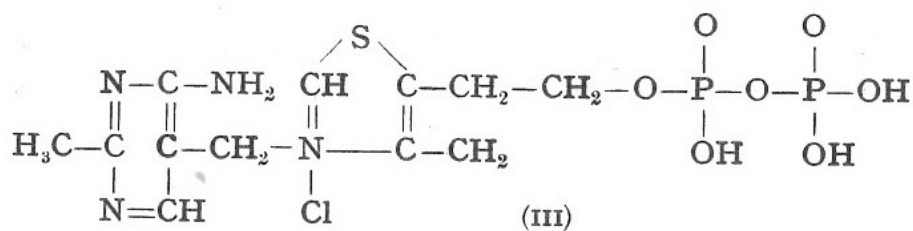
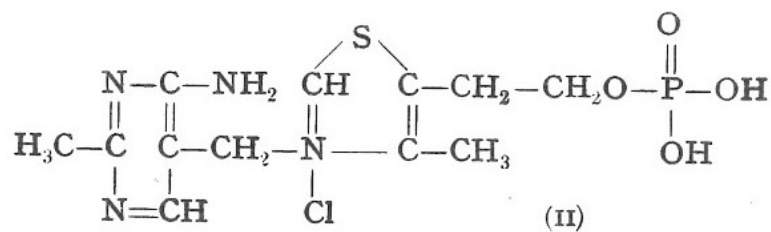
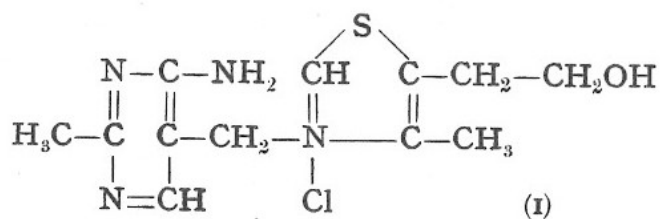


Fig. 1. - Risposta del *Penicillium chrysogenum* 152 alla tiamina e all'acetiltiamina.

ti attività dei composti esaminati: col metodo dei cilindretti di porcellana, infatti, si ottengono aloni di crescita o aloni di inibizione il cui diametro varia proporzionalmente al logaritmo della dose usata. Ciò permette di costruire, su carta semilogaritmica, curve con tratti rettilinei, attraverso cui è agevole il confronto dell'attività inibitrice o stimolante dei vari composti. Riportiamo nella Fig. 1, a titolo d'esempio, uno dei diagrammi ottenuti.

Per il *Myc.* sp. ceppo Pellegrino abbiamo usato il terreno di Sauton reso solido con l'aggiunta di agar. Per gli altri ceppi si è dimostrato idoneo il terreno di Czapek-Dox (NaNO_3 g 3; KCl g 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



g 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ g 0,01; KH_2PO_4 g 1; glucosio g 40; agar g 18; acqua q.b. a cm^3 1000).

PRODOTTI SAGGIATI.

Abbiamo provato le seguenti sostanze:

(I) Tiamina (Merck); (II) Estere monofosforico della tiamina (Merck); (III) Cocarbossilasi (Merck); (IV) Clorotiamina (preparata dal Prof. Velluz); (V) Acetiltiamina (Roche); (VI) Ossitiamina (California Found. Biochem. Res.); (VII) Piritiamina (Calif. Found. Biochem. Res.) e i prodotti di scissione solfitica della tiamina, da noi preparati: (VIII) 2-metil-4-amino-5-metilsolfon-pirimidina (« residuo pirimidinico ») e (IX) 4-metil-5 β -ossietil-tiazolo (« residuo tiazolico »).

I vari composti sono stati saggiati seguendo il già citato metodo dei cilindretti di porcellana, che venivano deposti sulla superficie di agar-germi in grandi piastre di vetro pyrex. Naturalmente, le concentrazioni saggate variavano per i diversi composti e per i diversi ceppi:

Tiamina ed esteri fosforici:	<i>Aspergillus</i>	0,05 - 5	mcg/cm ³
	<i>Penicillium</i>	»	»
	<i>Myc. sp. ceppo</i> Pellegrino	»	»
Clorotiamina:	<i>Aspergillus</i>	0,15 - 15	mcg/cm ³
	<i>Penicillium</i>	»	»
	<i>Myc. sp. ceppo</i> Pellegrino	0,015- 1,5	mcg/cm ³
Acetiltiamina:	<i>Aspergillus</i>	0,05 - 5	mcg/cm ³
	<i>Penicillium</i>	»	»
	<i>Myc. sp. ceppo</i> Pellegrino	»	»
Residuo pirimidinico e tiazolico		0,1 - 10	mcg/cm ³
Ossitiamina e piritiamina		1 - 1000	cmg/cm ³

Per le prove di inibizione venivano aggiunti al terreno 0,1 mcg di tiamina per cm^3 .

RISULTATI

Mentre il *Mycobacterium* sp. ceppo Pellegrino ha bisogno solo del residuo pirimidinico, *Aspergillus* e *Penicillium* richiedono la tiamina preformata.

L'azione della tiamina e dei suoi esteri fosforici (mono- e piro-) è, a parità di concentrazione molare, identica.

La clorotiamina e l'acetiltiamina hanno la stessa attività della tiamina sul *Myc. sp.* ceppo Pellegrino, ma sono molto meno attivi su *Aspergillus* e *Penicillium*: su *Aspergillus* la clorotiamina ha un'attività del 3% rispetto alla tiamina, l'acetiltiamina del 10%; su *Penicillium* la clorotiamina ha un'attività del 10%, l'acetil-tiamina del 4%. In nessuno di questi ceppi abbiamo potuto mettere in evidenza, per difficoltà tecniche, una trasformazione di clorotiamina o di acetiltiamina in tiamina.

L'ossitiamina favorisce la crescita di *Aspergillus* e leggermente (solo a forti concentrazioni) di *Penicillium*, è inattiva sul *Myc. sp.* ceppo Pellegrino.

La piritiamina favorisce la crescita del Pellegrino, inibisce quella di *Aspergillus* e *Penicillium*: per esempio, con una concentrazione di 10 mcg/cm³, il diametro degli aloni di inibizione è risultato di 30 mm per *Aspergillus*, 20 mm per *Penicillium* 152 e 60 mm per *Penicillium* 154.

Il residuo pirimidinico è utilizzato solo dal Pellegrino. Per mettere in evidenza la sintesi di tiamina da parte di questo germe, lo abbiamo fatto crescere in terreno liquido contenente 20 mcg/cm³ di residuo pirimidinico. Dopo 3 giorni a 37°, si procedette alla determinazione, chimica e microbiologica, della tiamina nel terreno e nel germe. Nel terreno la tiamina risultò praticamente assente, nel germe se ne trovarono 0,007 mcg per mg di peso secco.

Nessuno dei ceppi esaminati è stato capace di crescere in presenza del solo residuo tiazolico.

Questi risultati sono sintetizzati nella tabella 1.

TABELLA 1

Azione della tiamina e di suoi derivati sulla crescita di tre specie microbiche (*)

Sostanza	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Mycobacterium sp.</i> ceppo Pellegrino
Tiamina ed esteri fosforici	+	+	+
Clorotiamina	(+)	(+)	+
Acetiltiamina	(+)	(+)	+
Ossitiamina	+	(—)	0
Piritiamina	—	—	+
Residuo pirimidinico	0	0	+
Residuo tiazolico	0	0	0

(*) Azione attivatrice: +

» inibitrice: —

nessuna azione: 0

I simboli tra parentesi indicano una minore intensità dell'azione esplicita.

DISCUSSIONE

L'identità d'azione fra tiamina e suoi esteri fosforici sembra dimostrare la facilità con cui i microrganismi esaminati fosforilano la tiamina.

La lieve attività della clorotiamina e della acetiltiamina (che, non possedendo l'ossidrile alcoolico, non sono fosforilabili) si potrebbe spiegare in due modi: o il germe utilizza (con meccanismo sconosciuto) il prodotto non fosforilato, oppure rimette in libertà l'ossidrile, permettendo la fosforilazione. E' più probabile questa seconda ipotesi, perché altrimenti sarebbe difficilmente spiegabile come su *Aspergillus* l'acetiltiamina è più attiva della clorotiamina, mentre su *Penicillium* è meno attiva; questa diversità di comportamento si può invece spiegare ammettendo che, a causa del loro diverso contenuto enzimatico, l'*Aspergillus* possa più facilmente idrolizzare l'acetiltiamina, il *Penicillium* la clorotiamina. E' interessante a questo proposito osservare che nel piccione la clorotiamina ha un'attività pari a circa 1/300 di quella della tiamina, mentre l'acetiltiamina possiede all'incirca la stessa attività della vitamina non acetilata (³).

Il *Myc. sp. ceppo Pellegrino* utilizza la clorotiamina, l'acetiltiamina e perfino la piritiamina come la tiamina stessa perché abbisogna solo del residuo pirimidinico, che utilizza per la sintesi della tiamina. In letteratura abbiamo trovato che un altro micobatterio, « *Myc. agreste* », richiede anch'esso il solo residuo pirimidinico (⁴).

Il solo residuo tiazolico, come abbiamo detto, è inattivo su tutti i ceppi esaminati. Ciò significa che, in generale, il residuo pirimidinico è più difficilmente sintetizzabile di quello tiazolico; esso però, per essere utilizzato, deve contenere il gruppo amminico in posizione 4: infatti il *Myc. sp. ceppo Pellegrino*, che è sensibile al residuo pirimidinico, non lo è all'ossitiamina, mentre lo è alla piritiamina. Ciò è probabilmente in relazione con la necessità da parte di questi germi di utilizzare la cocarbossilasi sotto forma di pirofosfato di lipotiamide, nel quale, secondo REED e DE BUSCK (⁵), il legame tra la vitamina e l'acido lipoico avviene a livello del gruppo amminico della vitamina stessa.

E' interessante infine il comportamento della piritiamina, che inibisce competitivamente la crescita di *Aspergillus* e *Penicillium*, in quanto questi ceppi richiedono la tiamina preformata, mentre invece favorisce

quella del *Myc.* sp. ceppo Pellegrino, che ne utilizza solo il residuo pirimidinico, essendo autotrofo rispetto al gruppo tiazolico.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia e di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ROSSI G. A. e JACOLI G. G. - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 25: 826 (1949).
 - (²) LUTZ A. - Ann. Inst. Pasteur, 73: 1089 (1947).
 - (³) SCHULTZ F. - Ztf. physiol. Chem., 263: 113 (1940).
 - (⁴) LUTZ A. - Compt. Rend. Soc. Biol., 142: 1229 (1948).
 - (⁵) REED J. L. e DE BUSK B. G. - J. Amer. Chem. Soc., 74: 3437 et 3964 (1952).
-