

26. G. TIECCO e L. BELLANI. — **Ricerca degli estrogeni sintetici negli alimenti.** - Nota IV. Metodo di controllo microbiologico.

Riassunto. — Il dosaggio microbiologico per la determinazione quanti-qualitativa degli estrogeni di sintesi (stilbestrolo, esestrolo e dienestrolo) è stato controllato dagli AA. con risultati positivi anche se il metodo non viene ritenuto utilizzabile ai fini pratici del controllo delle derrate animali e vegetali sospette di contenere sostanze estrogene.

Summary. — Microbiological dosage in quanti-qualitative determination of synthetic estrogens (stilbestrol, exoestrol, dienoestrol) has been controlled by the AA.s with positive results, in spite of the fact that this method has not been found fit for practical application in control of animal and vegetable foods, in which presence of estrogenic substances may be suspected.

I vari metodi proposti per la ricerca delle sostanze estrogene richiedono un certo tempo per la loro esecuzione. Pertanto, la possibilità del ricorso a metodi di titolazione microbiologica consentirebbe di semplificare i procedimenti atti a svelare le sostanze ad attività estrogena, e abbreviare i tempi di esecuzione. Senza dire che tale metodo consentirebbe studi atti a stabilire il ruolo degli estrogeni di sintesi o naturali quali probabili metaboliti od antimetaboliti dei batteri.

La utilizzazione dei microorganismi a tale scopo, si avvera essenzialmente su due linee di ricerca. La prima è intesa a determinare la presenza di batteri o loro mutanti che abbisognino delle sostanze estrogene quali metaboliti essenziali per il loro sviluppo. Questo è in definitiva il modo con il quale si effettua la titolazione microbiologica delle vitamine e degli aminoacidi. La seconda, invece, è intesa a determinare la presenza di batteri la cui crescita è inibita dalle sostanze estrogene contenute nel mezzo di coltura. Questo è il caso del dosaggio microbiologico degli antibiotici.

Nel primo caso pertanto si avrà crescita solamente intorno al punto in cui la sostanza sarà stata deposta, ed il diametro dell'alone di crescita sarà tanto più grande quanto più forte è la concentrazione della sostanza.

Nel secondo caso si verificherà invece l'effetto opposto, cioè intorno al punto in cui è stata deposta la sostanza si avrà un alone di inibizione

della crescita batterica il quale, entro certi limiti, sarà proporzionale alla dose della sostanza stessa.

Le ricerche intese ad utilizzare i microorganismi per svelare la presenza delle sostanze ad attività estrogena non sono molto numerose. Tuttavia esistono lavori in entrambi i settori di studio sopra ricordati.

ADELBERG e coll. ⁽¹⁾ hanno tentato di produrre mutanti, utilizzando come agenti mutageni i RU, di *E. coli* ceppo K-12 e di *Saccaromyces cerevisiae* i quali richiedessero per il loro sviluppo uno steroide. I risultati cui gli AA. pervennero sono stati completamente negativi. Risultati simili sono stati ottenuti in prove preliminari pure da HANKA e coll. ⁽²⁾.

PORTES e coll. ⁽³⁾ invece trovarono che la follicolina alla concentrazione di 20.000 unità/litro aveva una azione favorevole sullo sviluppo di un ceppo *E. coli* ed attribuirono a questa azione il frequente verificarsi delle forme di colibacellosi durante la gestazione.

Più interessanti e significative furono le ricerche orientate a dimostrare una azione inibente degli steroidi sullo sviluppo batterico. FAULKNER ⁽⁴⁾ prendendo in esame vari estrogeni naturali e sintetici riuscì a dimostrare come lo stilbestrolo e l'esestrolo possedessero una attività antibatterica potendo agire a seconda della dose da sostanze battericide o batteriostatiche. L'A. prese in esame numerosi batteri gram positivi e gram negativi dimostrando che solamente i primi erano sensibili all'azione di questi estrogeni e che la concentrazione finale pur variando da germe a germe rimane compresa fra 1:5000 e 1:500.000.

In uno studio successivo lo stesso autore ⁽⁵⁾ dimostrò come fosse sufficiente un contatto di poche ore dello stilbestrolo con i bacilli tubercolari, perchè questi non fossero più in grado di determinare lesioni negli animali da esperimento.

Recentemente HANKA e coll. ⁽²⁾ hanno ripreso in esame l'argomento confermando quanto già precedentemente dimostrato da FAULKNER ⁽⁴⁾ e provando come fosse possibile utilizzare il metodo microbiologico per un dosaggio del dietilstilbestrolo. Gli AA. servendosi di un particolare ceppo di *Staph. aureus* hanno messo a punto un dosaggio in agar e in brodo sensibile rispettivamente fino alla dose di 200 γ e 2 γ/cm^3 .

Le conclusioni quindi che si possono trarre dai dati bibliografici esistenti sull'argomento, anche se non molto incoraggianti, possono così essere riassunte:

1) gli estrogeni sintetici non esercitano una azione favorevole sullo sviluppo batterico e pertanto questa via di indagine non può essere utilizzata per il rivelamento di queste sostanze;

2) stilbestrolo ed esestrolo inibiscono lo sviluppo solamente dei germi gram positivi, mentre non influenzerebbero minimamente i gram negativi;

3) l'azione inibente varia con il ceppo batterico in esame.

Dovendo mettere a punto un metodo per la ricerca degli estrogeni sintetici nei mangimi e nelle carni di animali destinati all'alimentazione umana, ci è sembrato interessante riprendere in esame l'argomento allo scopo di stabilire se fosse possibile ritrovare un metodo simile a quello utilizzato per titolare le sostanze antibiotiche.

MATERIALI E RISULTATI

Per facilitare le nostre indagini preliminari le ricerche venivano effettuate su piastre Petri utilizzando come terreno per lo sviluppo agar-triptosio. I tre estrogeni da noi impiegati (stilbestrolo, esestrolo, dienestrolo) venivano sciolti in metanolo e diluiti nelle concentrazioni volute, utilizzando sempre lo stesso solvente.

Nelle prove orientative abbiamo adottato la stessa tecnica in uso per il dosaggio degli antibiotici. Sono state impiegate due diluizioni ($500 \gamma/\text{cm}^3$ e $100 \gamma/\text{cm}^3$) per ciascun estrogeno. La scelta di queste diluizioni, suggerite dai risultati ottenuti da HANKA e coll. ⁽²⁾, ci permetteva di individuare i ceppi sensibili e nello stesso tempo di svelare fin dal primo esame un ceppo più sensibile dello *Staph. aureus* riferito da questi AA. Con ogni ceppo batterico in esame veniva preparata una piastra di agar germi e, sulla sua superficie, si depositavano dei cilindretti di materiale isolante precedentemente immerso nella diluizione voluta. Al centro della piastra veniva, come controllo, posto un cilindretto immerso in metanolo allo scopo di svelare se una eventuale inibizione fosse attribuibila alla sostanza in esame oppure al solvente impiegato.

Le piastre così preparate venivano lasciate a temperatura ambiente per 30', quindi incubate a 37°C per 24h dopo di che si procedeva alla lettura misurando gli aloni di inibizione.

I risultati di queste prove sono riportati nella tabella 1, dalla quale emerge quanto segue:

Ricerca di ceppi batterici sensibili agli estrogeni.

TABELLA 1

	ALONE DI INIBIZIONE mm.					
	Stilbestrolo		Esestrolo		Dienestrolo	
	500	100	500	100	500	100
<i>Bacillus anthracis</i>	21	0	19	0	15	0
» <i>cereus</i>	15	15	20	15	20	15
» <i>circulans</i>	20	12	26	17	24	12
» <i>coagulans</i>	23	17	24	15	25	16
» <i>laterosporus</i>	20	16	15	12	25	15
» <i>megaterium</i>	20	12	19	12	19	10
» <i>pumilus</i>	20	0	19	0	15	0
» <i>sphaericus</i>	15	15	18	18	19	10
» <i>subtilis</i> ATCC6633	19	0	18	0	17	0
» » ATCC9799	0	0	15	0	15	0
» » ATCC9524	21	0	19	0	0	0
<i>Micrococcus epidermidis</i>	15	0	16	0	11	0
» <i>flavus</i>	13	0	15	0	15	0
» <i>lysodeicticus</i>	18	0	13	0	30	0
<i>Saccina lutea</i>	20	0	20	0	22	0
<i>Staphilococcus aureus</i>	18	0	16	0	18	0
» <i>aureus</i>	16	0	16	0	16	0

a) tutti e tre gli estrogeni sintetici hanno un'azione batteriostatica quando usati alla dose di 500 γ/cm^3 . Solamente due ceppi batterici, sui 17 saggiati, (*B. subtilis* ATCC 9799 ed ATCC 9524) sono risultati insensibili all'azione, rispettivamente, dello stilbestrolo e del dienestrolo;

b) l'azione dei tre estrogeni sintetici è sovrapponibile determinando degli aloni d'inibizione pressochè di eguale diametro;

c) sui 117 ceppi batterici saggiati, solamente 6 risultano essere sensibili pure alla dose di 100 γ/cm^3 ;

d) tutti i ceppi sensibili alla dose di 100 γ/cm^3 di un estrogeno presentano questa sensibilità pure nei riguardi degli altri due;

e) il metanolo non presenta alcuna azione inibente sulla crescita dei batteri saggiati.

Le prove effettuate sui 7 ceppi che si erano dimostrati sensibili alla dose di 100 γ/cm^3 di estrogeno ci hanno permesso di notare come i ceppi più sensibili fossero *B. coagulans*, *B. circulans* e *B. latero sporus*. In base alla chiarezza degli aloni di inibizione nonchè alla costanza dei risultati, si è data preferenza per ulteriori saggi di specifica sensibilità a dosaggi inferiori al *B. latero sporus*.

Questi saggi venivano effettuati sia in agar, inviando le stesse piastre impiegate per la titolazione degli antibiotici (40 × 40 cm), che in brodo:

a) titolazione di agar. cm³ 250 di agar triptosio venivano insemen-
zati con cm³ 2,5 di una brodo-coltura di 24h di età del germe in esame e,
previa agitazione, l'agar veniva deposto sulla piastra e lasciato solidifi-
care. A solidificazione avvenuta, venivano deposti sulla sua superficie i
cappuccetti di materiale isolante immersi nella diluizione voluta dello
estrogeno. Per ogni dose venivano effettuate 3 pesate. Quindi la piastra
veniva lasciata per 1h in frigorifero a +4°C per permettere la diffusione
della sostanza, quindi posta in termostato a 37°C per 24h. Gli aloni otte-
nuti per ogni dose venivano sommati e quindi si ricavava la media. I ri-
sultati ottenuti sono riportati nella tabella 2.

TABELLA 2

	100 γ	75 γ	50 γ	25 γ	10 γ	5 γ	1 γ
Esestrolo	12	10	8	T	—	—	—
Dienestrolo	15	12	10	T	—	—	—
Stilbestrolo	16	13	11	T	—	—	—

b) titolazione in brodo semplice. Ai tubi utilizzati per la prova,
contenenti cm³ 7 di brodo, veniva aggiunto 1 cm³ della diluizione voluta
dell'estrogeno. Le provette erano quindi fatte bollire in modo da permet-
tere l'evaporazione del metanolo e, a raffreddamento avvenuto, insemen-
zate con cm³ 0,05 di una brodo-coltura di 24h di età del germe test. La
lettura veniva effettuata dopo 24h di permanenza in termostato a 37°C.
I risultati sono riportati nella tabella 3.

TABELLA 3

	250	100	50	10	5	1	0.5	0.25	0.1
Esestrolo	—	—	—	±	+	+	+	+	+
Dienestrolo	—	—	—	±	+	+	+	+	+
Stilbestrolo	—	—	—	±	+	+	+	+	+

I risultati ottenuti da queste prove, anche se non del tutto soddisfacenti, ci hanno indotto ad utilizzare il dosaggio microbiologico nella ricerca delle sostanze estrogene negli estratti eteri ottenuti da mangimi estrogenizzati e da carni di pollo trattati con questi mangimi. Le tecniche di estrazione verranno discusse in una nota successiva alla quale si rimanda per i particolari.

I risultati ottenuti non depongono favorevolmente per l'utilizzazione pratica del metodo microbiologico sia perchè la sensibilità dei germi test alle dosi delle sostanze estrogene da determinare è troppo scarsa, sia anche perchè molto probabilmente le tecniche preliminari di estrazione degli estrogeni dalle derrate animali e vegetali comportano la presenza accanto alle sostanze estrogene ricercate, di altre la cui azione sul metabolismo batterico ci è ignota.

In conclusione potrebbe negarsi la utilità pratica dell'adozione del metodo microbiologico ai fini della determinazione quanti-qualitativa delle sostanze estrogene nei mangimi, nelle carni e nei prodotti derivati da animali trattati con sostanze estrogene.

Tuttavia, sembra degno di interesse, sulla base delle suesposte osservazioni, proseguire le ricerche allo scopo di isolare qualche microorganismo elettivamente sensibilissimo all'azione inibente delle sostanze estrogene nel mezzo culturale ed altresì, di escogitare accorgimenti particolari atti da un lato ad esaltare l'azione batteriostatica degli estrogeni e dall'altro capaci di neutralizzare, dopo averli identificati, eventuali principi di sostanze ottenute con l'estrazione, e dotate di qualche azione sulla crescita dei germi impiegati quali test.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ADELBERG E. A., ROSLANSKY P. F., MYERS J. W. e COUGHLIN C. A. - J. Bact., 69: 733 (1955).
 - (²) HANKA L. J. e LOCKHART W. R. - J. Bact., 75: 471 (1958).
 - (³) PORTES L., LANTZ N. e KRAJEVITCH A. - Compt. rend. Soc. Biol., 131: 704 (1939).
 - (⁴) FAULKNER G. H. - Lancet, 245: 38 (1943).
 - (⁵) FAULKNER G. H. - Am. Rev. Tuberc., 50: 167 (1944).
-