

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCII.

1905

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVICCI

1905

lo, e inoltre la verità che non si può negare che per effetto di un  
azioni chimiche, il carbonio, ossigeno, idrogeno, azoto, calcio, fosforo,  
sulfuro, magnesio, ferro e sodio si combinano, e per effetto di esse

Chimica. — *Sulla fermentazione della guanina*. Nota di C. ULPIANI e M. CINGOLANI, presentata dal Socio E. PATERNÒ.

di (In un nostro precedente lavoro sul meccanismo biochimico della fermentazione dell'acido urico (1) avevamo constatato che il batterio dell'acido urico non attaccava menomamente la guanina. In questo lavoro abbiamo voluto ricercare se la guanina, che è pure, come l'acido urico, un prodotto del metabolismo animale, e si ritrova come tale nel letame, nei prodotti delle putrefazioni, ecc., potesse subire un processo fermentativo per opera di qualche altro microorganismo non ancora noto. Tale studio acquistava un certo interesse come contributo alle nostre conoscenze sulla circolazione dell'azoto dal punto di vista biologico.

Nostro primo pensiero è stato quindi la ricerca e l'isolamento di un tale microorganismo, e mercè un procedimento, che in seguito descriveremo, siamo riusciti ad isolare dal letame di colombaia un batterio ben caratterizzato, il quale attacca la guanina, la scinde, ossia ne produce la fermentazione. Soluzioni acquose sature di guanina, sterilizzate, se vengono innestate con questo microorganismo allo stato di coltura pura, e mantenute a 30°-35°, già dopo 2-3 giorni non danno più affatto la reazione caratteristica della guanina, che prima dell'innesto davano nettissima, mentre il liquido diventa dapprima opalescente e poi leggermente intorbidato. La reazione della guanina consiste, come si sa, nello svaporare sino a secchezza in capsula di porcellana, dopo aggiunta di qualche goccia di acido nitrico, il liquido in cui è sciolta: si ottiene così un residuo giallo che per aggiunta di qualche goccia di potassa diventa rosso: la reazione è sensibilissima, e svela tracce minime di guanina. Le stesse soluzioni acquose sature di guanina sterilizzate ma non innestate col microorganismo in parola, lasciate a sè, danno ancora nettissima dopo 7-9 mesi la suddetta reazione.

Un'osservazione da noi fatta e ripetutamente confermata, e che ci sembra interessante, è la seguente: come il batterio dell'acido urico non attacca la guanina nè si sviluppa nel liquido di coltura alla guanina, così il microorganismo da noi isolato, che fermenta la guanina, non esercita la benchè minima azione sull'acido urico, nè si sviluppa menomamente nel liquido di coltura all'acido urico, quantunque per alcuni caratteri morfologici e culturali assomigli all'altro batterio.

In questo nostro lavoro non abbiamo potuto eseguire la ricerca quantitativa dei prodotti della fermentazione della guanina con quella esattezza

(1) Gazz. Chim. Italiana, 1904, p. 2°.

con la quale avevamo studiato la fermentazione dell'acido urico, perché abbiamo riscontrato un'insuperabile difficoltà nella scarsissima solubilità della guanina nell'acqua: ciò non pertanto i risultati ottenuti nella ricerca qualitativa ci hanno sufficientemente dimostrato il procedimento della fermentazione stessa. I prodotti, che si ottengono costantemente in questa fermentazione, sono: anidride carbonica, urea e guanidina, per cui ci crediamo autorizzati, dopo i nostri studi sulla fermentazione dell'acido urico, ad impiantare per la fermentazione della guanina la seguente equazione:



*Isolamento del batterio della guanina.*

Il metodo seguito per isolare questo batterio è stato il seguente: del letame di colombaia venne stemperato in acqua in un pallone, e dopo alcuni giorni, quando si notò un manifesto movimento fermentativo nel pallone, vennero eseguiti dei passaggi successivi in serie, dapprima in palloncini contenenti il medesimo materiale sterilizzato, e poi in tubetti contenenti una soluzione satura di guanina e tracce di sali (fosfato sodico, cloruro sodico e solfato potassico). Già dopo 24 ore il liquido diventava opalescente e leggermente intorbidato, e dopo 2-3 giorni non dava più la reazione della guanina, che presentava invece nettissima lo stesso liquido di altri tubetti di controllo non innestati. Facendo quindi le piastre in agar e da queste nuovamente passaggi in liquido alla guanina, si è potuto isolare un batterio, che in coltura pura, innestato in una soluzione satura di guanina, alla temperatura di 33-35°, la fermenta completamente in 2-3 giorni.

*Caratteri morfologici.*

Il microrganismo isolato presenta caratteri morfologici che lo fanno ascrivere alla classe dei cocco-batteri: è rappresentato prevalentemente da forme a corti bastoncini, lunghi circa 2  $\mu$ , con le due estremità rigonfiate e più rifrangenti, piuttosto grossi e tozzi, nettamente capsulati: queste forme viste in direzione verticale assumono l'aspetto di grossi cocchi isolati e capsulati: si presenta pure sotto forma di grossi filamenti lunghi 6-8  $\mu$ , risultanti da 3-4 segmenti abbastanza netti e distinti, forniti di un'unica capsula, e tali filamenti aumentano di numero con l'invecchiare della coltura. Inoltre anche per questo microrganismo, come fu osservato per quello dell'acido urico, mano mano che le colture s'invecchiano, specialmente in quelle costituite da soluzioni sature di guanina e sali, si notano dei fenomeni di manifesta batteriolisi. Infatti al secondo giorno dall'innesto si osserva che prendono la prevalenza sulle forme bacillari isolate, le forme filamentose, che possono considerarsi regressive e cominciano a comparire dei corpuscoli protoplasmatici piccolissimi, amorfi, inattivi, che si colorano fortemente, il cui numero

va sempre aumentando con l'invecchiare della cultura, sino a che al settimo-ottavo giorno, quando le culture si manifestano sterili, le forme bacillari sono quasi totalmente scomparse e non si vedono che ammassi dei suddetti corpuscoli protoplasmatici amorfi.

Il microrganismo non resiste alla decolorazione con il metodo di Graam; esso è mobilissimo: specialmente le forme tipiche a corti bastoncini sono dotate di movimenti vivacissimi, ma anche le forme filamentose hanno movimenti abbastanza vivaci a zig-zag; si colora bene e presto con la fucsina (liquido di Zielh) e con il violetto di genziana, assumendo una colorazione uniforme: con la prima colorazione specialmente si mette nettamente in evidenza la capsula.

#### *Caratteri culturali.*

*Culture a piatto.* — In agar-agar dà dopo 2-3 giorni colonie piccole, rotonde, bianche, umidicce, piuttosto pianeggianti, a contorno regolare, senza aloni periferici: dopo dieci giorni si presentano più ingrandite ma senza modificazioni notevoli. Osservate al microscopio le colonie risultano costituite da una massa finamente granulosa, omogenea, a bordo finamente seghettato e piccolo centro più spesso e rifrangente, irregolare.

In gelatina, pure in cultura a piatto, dà colonie che presentano presso a poco gli stessi caratteri, solo che sono più piccole. La gelatina non viene fluidificata.

*Strisciamento su agar.* — Nell'agar-agar solidificato a becco di flauto dà luogo a formazione di colonie grandi, staccate, rotonde, bianco-azzurrine, pianeggianti, a contorno netto, omogenee, che già al secondo giorno confluiscono a formare una patina bianca, continua, sottile, umidiccia, liscia: l'acqua di condensazione s'intorbida.

*Culture liquide.* — Si sviluppa assai bene e rapidamente nel brodo peptonizzato, intorbidandolo uniformemente, formando un deposito polveroso nel fondo e un velo azzurrognolo sottilissimo, ma assai evidente, in superficie, senza però dar luogo a formazione di fiocchetti sospesi.

Si sviluppa pure bene, ma più lentamente nel peptone puro, e benissimo e presto nel peptone alla guanina, intorbidandolo, e formando deposito sul fondo, ma senza velo in superficie.

Se si innesta con tale microrganismo un liquido costituito da soluzione acquosa satura di guanina con aggiunta di una piccolissima quantità di sali, si osserva che la soluzione, limpida prima dell'innesto, dopo un giorno si fa opalescente, al 2°, leggermente s'intorbida, e, massime al 3° giorno, non dà più menomamente la reazione della guanina, mentre al 6°-7° giorno i passaggi fatti da queste culture riescono sterili.

Non si sviluppa menomamente nel liquido costituito da soluzione satura di acido urico e sali.

RICERCA QUALITATIVA.

Volendo studiare il modo come procede la fermentazione e quindi la demolizione della molecola della guanina, noi ci siamo dovuti contentare di ricerche solo qualitative dei prodotti della fermentazione, poichè per quanti tentativi abbiamo fatto non ci è stato possibile di eseguire con precisione un dosaggio quantitativo di essi a causa della scarsissima solubilità della guanina. Siamo però riusciti ad isolare i prodotti ultimi della fermentazione adoperando grandi quantità di soluzione satura di guanina.

Dopo alcune prove preliminari più in piccolo, i risultati delle quali corrispondono esattamente a quelli della ricerca, che ci accingiamo a descrivere, abbiamo preparato in un grande boccione un liquido costituito da 8 litri di acqua distillata in cui era disciolto circa un grammo di guanina, più una piccola quantità dei sali necessari al ricambio materiale del microrganismo.

Tale liquido, di debolissima reazione alcalina, dopo essere stato sterilizzato, venne innestato con il Batterio della guanina, e tenuto in termostato a 35°. Dopo 6 giorni il liquido era leggermente intorbidato, non dava più affatto la reazione della guanina e presentava invece reazione alcalina molto più evidente e spiccata che prima dell'innesto. In esso fu dimostrata la presenza di CO<sup>2</sup>, facendo gorgogliare aria, privata di anidride carbonica per ripetuti lavaggi in soluzione concentrata di KOH, prima traverso il liquido stesso e poi traverso una soluzione limpida di barite, che s'intorbidò fortemente.

Il liquido di fermentazione svaporato sino a secchezza lasciò un residuo, solo in parte solubile nell'alcool assoluto: dalla soluzione alcoolica cristallizzò una sostanza bianca, splendente in lunghi aghetti prismatici, fondenti a 32°, che per il suo aspetto cristallografico, per le sue proprietà e specialmente per i caratteri del precipitato bianco voluminoso, che dava con soluzione di nitrato mercurico, noi identificammo per *urea*.

La seguente determinazione d'azoto, che noi ne eseguiamo, ci confermò la sostanza essere urea: infatti gr. 0,9832 della sostanza dettero mgr. 38,72 di azoto, ossia:

Per cento

Azoto trovato  
46,54

Calcolato per CO(NH<sup>2</sup>)<sub>2</sub>  
46,66

La parte del residuo insolubile in alcool venne disciolta in acqua e trattata con una soluzione satura a freddo d'acido picrico: si ottenne così un precipitato giallo voluminoso che venne cristallizzato. Per la sua forma cristallina a lamelle (1), per il modo come era stato ottenuto, per il suo punto

(1) V. Emick-Monatsch. XII, 25.

di fusione a 276°, supponendo fosse *picrato di guanidina*, ne facemmo una determinazione di azoto, che confermò pienamente la nostra supposizione:

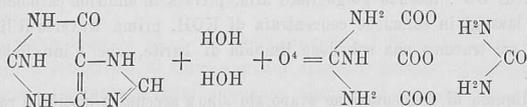
infatti gr. 0,1084 della sostanza dettero mgr. 32,2 di azoto, ossia:

Per cento	Calcolato
Azoto trovato	per $\text{CH}_2\text{N}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_2\text{OH}(\text{NO}_2)_2$
29,9	29,2

Perciò i prodotti ultimi della fermentazione della guanina sono rappresentati da  $\text{CO}^2$ , *urea* e *guanidina*, e quindi tale fermentazione può essere rappresentata con la seguente equazione chimica:



Possiamo quindi concludere che anche in questo caso, come nella fermentazione dell'acido urico, si tratta evidentemente di due processi, uno idrolitico, mercè il quale si distaccano i due gruppi laterali della molecola della guanina sotto forma l'uno di guanidina, l'altro di urea, e un processo ossidativo, mercè del quale l'asse tricarbonico centrale viene completamente bruciato:



Che questa sia una vera e propria fermentazione è provato sia dal fatto che lo sviluppo del microorganismo è enorme nel liquido di coltura costituito da una soluzione satura di guanina e sali, e raggiunge il suo massimo al 2° giorno dall'innesto, sia dal fatto che già al 2°-3° giorno di coltura scompare completamente nel detto liquido la reazione sensibilissima della guanina, il che dimostra che questa è stata completamente scissa per opera del batterio.