

tiotico e l'acido tiotico ridotto, esercitassero un'azione protettiva nell'intossicazione da cianuro di potassio, qualora fossero somministrati preventivamente. D'altro canto se l'effetto protettore dell'acido tiotico era dovuto principalmente alla presenza di gruppi tiolici o disolfuri nella sua molecola, anche altre sostanze contenenti tali gruppi dovevano presentare la medesima attività: per tale ragione abbiamo sperimentato parallelamente come protettori la cisteina, il BAL (dimer-captopropanolo), la pantetina (bis-N-pantotenilamido-etil-disolfuro) ed il tiosolfato sodico.

Può essere inoltre interessante rammentare che in alcuni altri tipi di intossicazione l'acido tiotico si è dimostrato più attivo del BAL².

Per questi esperimenti sono stati utilizzati topolini di sesso maschile, di peso compreso tra 20 e 25 g, provenienti dal nostro allevamento, ed in ottime condizioni generali.

Gli animali sono stati suddivisi in 7 gruppi di 20 ciascuno: il primo gruppo riceveva solo KCN (15 mg/kg) per via sottocutanea, agli altri 6 gruppi il KCN veniva somministrato per la stessa via ed alla stessa dose, 10 min dopo l'iniezione della sostanza protettiva.

Il secondo gruppo era protetto con acido tiotico (AT), contenente il legame disolfuro, che veniva somministrato alla dose di 46 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,23%, allestita al momento dell'uso).

Il terzo gruppo era protetto con acido tiotico ridotto (ATH), contenente cioè 2 gruppi -SH, che veniva somministrato alla dose di 48 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,24% allestita al momento dell'uso).

Il quarto gruppo era protetto con cisteina (CIST) che veniva somministrata alla dose di 76 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,38% allestita al momento dell'uso).

Il quinto gruppo era protetto con BAL che veniva somministrato alla dose di 28 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione acquosa allo 0,14% allestita al momento dell'uso).

Il sesto gruppo era protetto con pantetina (PANT) che veniva somministrata alla dose di 124 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,62% allestita al momento dell'uso).

Il settimo gruppo era protetto con il tiosolfato sodico (TIOS) alla dose di 114 mg/kg (soluzione allo 0,57% preparata al momento dell'uso).

Le dosi di AT, ATH, BAL, PANT erano equimolecolari con quella di KCN, quelle di CIST e TIOS erano due volte molecolari.

In esperimenti antecedenti ci eravamo assicurati che per nessuna sostanza le dosi impiegate fossero tossiche o in qualche modo dannose per gli animali.

I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella.

Per calcolare le percentuali di mortalità, l'errore standard σ_M e t ci siamo serviti dei metodi consigliati da GÜNTHER³ e la probabilità P è stata ricavata dalle tabelle di FISHER e YATES⁴.

I valori di t e P sono stati calcolati rispetto agli animali del primo gruppo.

Dai risultati esposti in Tabella e dalla analisi statistica effettuata, appare chiara l'azione protettiva esercitata dall'acido tiotico in verità assai più spiccata per l'ATH.

D'altro canto i risultati ottenuti con il BAL non si discostano da quelli osservati per l'acido tiotico.

Per la cisteina e per il tiosolfato i risultati sono indubbiamente meno probativi e con questi prodotti ci troviamo al limite della significatività.

Ani- mali N°	KCN mg/kg sotto- cute	Sostanza pro- tettiva e dose mg/kg endo- peritoneo	Mortalità			
			N° animali morti	% $\pm \sigma_M$	t	P
20	15	—	17	82 $\pm$ 8	—	—
20	15	AT-46	9	45 $\pm$ 10	2,8	0,01– 0,001
20	15	ATH-48	3	18 $\pm$ 8	5,6	<0,001
20	15	CIST-76	12	59 $\pm$ 10	1,77	0,1– 0,05
20	15	BAL-28	8	41 $\pm$ 10	3,15	0,01– 0,001
20	15	PANT-124	15	73 $\pm$ 9	1,09	0,3– 0,2
20	15	TIOS-114	11	54 $\pm$ 10	2,08	0,05– 0,02

Quasi del tutto negativi infine i risultati osservati con la pantetina.

L'insieme dei dati esposti parrebbe quindi confermare che l'azione protettiva dell'acido tiotico nella intossicazione acuta da KCN è dovuta solo in parte alla presenza nella sua molecola di gruppi tiolici, ma più probabilmente ad un suo intervento come sostanza coenzimatica.

E. CUTOLO e F. REDUZZI

Laboratorio Ricerche dell'Istituto Sieroterapico Italiano,
Napoli, 12 dicembre 1955.

Summary

The protective action of thioctic acid and of its reduced form in acute potassium cyanide poisoning has been studied in comparison with the antitoxic action of other compounds with mercapto or disulfide groups.

The results permit the following conclusions: (1) Maximum protective action is given by reduced thioctic acid; (2) thioctic acid and BAL have almost the same activity; (3) cysteine and sodium thiosulfate have a protective activity of a much lower order; (4) panthethine is almost inactive. The authors offer the hypothesis that the greater activity of thioctic acid is due to its possible presence as coenzyme in rhodanese.

² F. REDUZZI, Boll. Soc. Ital. Biol. sperim. 31, 615 (1955). – P. BONI, F. REDUZZI, G. BILE e V. GALLORO, Clin. Terap. 9, 129 (1955). – L. DONATELLI, Relazione al Simposio Intern. sull'Acido Tiotico, Napoli 28–29 nov. 1955 – Atti (in corso di stampa).

³ G. POUMEAU-DELILLE, *Techniques biologiques en endocrinologie expérimentale chez le rat* (Masson, Paris 1953), p. 161.

⁴ R. A. FISHER e F. YATES, *Statistical Tables* (Oliver and Boyd, London 1948), p. 32.

The Role of pH in Nitrogen Utilization by *Piricularia oryzae*

In preliminary studies on the physiology of *Piricularia oryzae*, the fungus causing the blast disease of rice, it was found that the isolate used failed to utilize the usual in-

organic ammonium nitrogen sources such as ammonium chloride, ammonium sulphate and ammonium nitrate, whereas it readily utilized other nitrate sources, supplied as the sole source of nitrogen in Richard's medium. When mixtures of potassium nitrate and ammonium sulphate in varying percentages (keeping the total nitrogen levels constant) were supplied, the growth of the fungus was inhibited when the ammonium nitrogen exceeded 10% of the total nitrogen in the medium. However, the addition of organic acids (fumaric, succinic, tartaric, citric, oxalic, acetic and lactic acids at 0.5% levels) readily aided the utilization of inorganic ammonium nitrogen. Such stimulatory action of organic acids of the Krebs cycle in the utilization of inorganic ammonium has been recorded by many workers¹ and two explanations have been offered for such stimulation. While MACHLIS² has stressed the importance of pH, BRIAN *et al.*³, working with *Metarrhizium glutinosum*, do not consider pH to be the causal factor; the organic acids are supposed to aid the formation of α -keto acids of the Krebs cycle which interact with the inorganic ammonium in the synthesis of aspartic and glutamic acids. Hence, more intensive work aimed at elucidating the factors responsible for such stimulation was undertaken.

From a study of the final pH of the medium after 18 days' incubation it was seen (Table) that it fell to 2.8 in the unsupplemented ammonium sulphate medium, whereas it remained steady at 4.0 with the nitrate source. It is probable that the steep fall in the final pH of the ammonium medium (far below the optimum range) to as low a level as 2.8 might be responsible for the very poor growth. It was therefore considered worthwhile investigating whether a proper control of pH during growth might aid the utilization of ammonium nitrogen. Poorly ionized inorganic ammonium nitrogen sources, ammonium carbonate and ammonium phosphate $[(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4]$, which have strong buffering action, were therefore supplied as sole source of nitrogen. The results, as can be seen from the Table, clearly indicate that the fungus could make normal growth with these sources of nitrogen. It is interesting to observe that the final pH of the medium with these two sources of nitrogen and also with nitrate-ammonium mixtures, where the ammonium nitrogen did not exceed 10% of the total, are in the range of 3.6 to 4.0. The incorporation of an acid neutralizer such as calcium carbonate (separately sterilized and added to the medium to avoid adsorption) at the rate of 0.4% in the ammonium sulphate medium resulted in normal growth of the fungus accompanied by a final pH of 6.3. It is therefore evident from the results that the pH of the medium during growth is a vital factor controlling the utilization of strongly ionized inorganic ammonium nitrogen.

It is probable that an efficient control of the pH of the medium during growth might result in the initial synthesis of four carbon dicarboxylic acids which as indicated by BRIAN *et al.*³ might favourably influence the formation of the Krebs intermediaries for the synthesis

of aspartic and glutamic acids. While nothing conclusive is known of the *modus operandi* of organic acids in stimulating growth and aiding utilization of inorganic ammonia, it is not presumptuous to postulate that they might act as buffering agents controlling the pH of the

Nitrogen sources	Mat weight in mg	Final pH
1. Potassium nitrate	178	4.0
2. Ammonium sulphate	27	2.8
3. Ammonium sulphate (+ succinic acid 0.5%)	165	4.6
4. Ammonium carbonate	142	3.9
5. Ammonium phosphate $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	136	3.6
6. Ammonium sulphate (+ Calcium carbonate 0.4%)	128	6.3
7. Potassium nitrate: Ammonium sulphate		
a) 9.5:0.5	188	3.9
b) 9.0:1.0	185	3.9
c) 8.0:2.0	45	2.9
d) 7.0:3.0	31	2.8
e) 6.0:4.0	33	2.9
f) 5.0:5.0	27	2.9
g) 2.5:7.5	29	2.8

All nitrogen sources were supplied on equal nitrogen basis. Cultures were grown in Richard's medium supplemented with thiamine 5.0 μg and biotin 0.1 μg per flask for 18 days in 250 ml Erlenmeyer flasks with 25 ml medium per flask. Mycelia were dried at 65°C for 48 h and dried to constant weight in a dessicator over anhydrous calcium chloride. Initial pH of the media was adjusted to 6.0 in each case.

medium at the optimum level during growth. The foregoing findings indicate that the ability of fungi to utilize different forms of nitrogen would depend on the pH changes during growth and in light of this, the classification of fungi based on their utilization of different forms of nitrogen suggested by ROBBINS⁴ may have to be modified as already suggested by BRIAN *et al.*³.

I thank Prof. T. S. SADASIVAN and Dr. C. V. SUBRAMANIAN for guidance and Mr. K. LAKSHMINARAYANAN for suggestions.

A. APPARAO

University Botany Laboratory, Madras-5, India, December 30, 1955.

Zusammenfassung

Eine Reinkultur des Reisparasiten *Piricularia oryzae*, der Stickstoff aus Nitraten benutzen, nicht aber aus stark ionisiertem anorganischem Ammoniak ausnützen kann, entwickelte sich besonders günstig, wenn die Wasserstoffkonzentration während des Pilzwachstums genau kontrolliert wurde.

⁴ W. J. ROBBINS, Amer. J. Bot. 24, 243 (1937).

¹ L. H. LEONIAN and V. G. LILLY, Amer. J. Bot. 34, 131 (1940). – P. R. BURKHOLDER and I. McVEIGH, Amer. J. Bot. 34, 634 (1940). – P. W. BRIAN, P. J. CURTIS, and H. C. HEMMING, Proc. roy. Soc. [B] 135, 106 (1947). – K. BERNHARD and H. ALBRECHT, Helv. chim. Acta 30, 627 (1947). – H. S. REISCHER, Mycologia 43, 319 (1951). – L. MACHLIS, Amer. J. Bot. 40, 189 (1953). – J. HACSAYLO, V. G. LILLY, and H. L. BARNETT, Mycologia 46, 691 (1954).
² L. MACHLIS, Amer. J. Bot. 40, 189 (1953).
³ P. W. BRIAN, P. J. CURTIS, and H. C. HEMMING, Proc. roy. Soc. [B] 135, 106 (1947).