

46. Mario PRINCIVALLE. — Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B. - I. Un nuovo metodo per la titolazione della tiamina (vitamina B₁).

Riassunto. — Il metodo descritto si basa sull'utilizzazione di un mutante di *Penicillium chrysogenum* che esige specificamente la tiamina.

La titolazione si fa col metodo delle capsule di porcellana in terreno di Czapek-Dox solido.

Il diametro degli aloni di crescita varia linearmente col logaritmo della dose nell'ambito compreso tra mcg 0,02 e mcg 1 di tiamina per cm³.

Résumé. — La méthode décrite est basée sur l'utilisation d'un mutant de *Penicillium chrysogenum* qui demande spécifiquement la thiamine. Le titrage se fait par la méthode des petites capsules de porcelaine dans le milieu de Czapek-Dox solide.

Le diamètre des halos de croissance varie d'une façon linéaire avec le logarithme de la dose dans les mesures comprises entre mcg 0,02 et mcg 1 de thiamine pour cm³.

Summary. — The method described is based on the utilisation of a mutant of *Penicillium chrysogenum* with a specific requirement for thiamine. The assay is performed using the porcelain cup technique on solid Czapek-Dox medium. The diameter of the halo of growth varies linearly with the logarithm of the dose in the range 0.02-1.0 µg of thiamine per ml.

Zusammenfassung. — Die geschilderte Methode bedient sich eines Mutanten von *Penicillium chrysogenum* der einen spezifischen Thiaminbedarf aufweist. Die Titrierung erfolgt mit Porzellankapseln auf festem Nährboden nach Czapek-Dox. Der Durchmesser der Wachstumsringe wächst linear mit dem Logarithmus der Dose für Konzentrationen von 0,02 bis 1 mcg/cm³ von Thiamin.

I metodi microbiologici per la determinazione quantitativa delle vitamine e degli aminoacidi trovano utili applicazioni in molti casi e si dimostrano insostituibili in molte condizioni. Essi sono generalmente più sensibili dei metodi chimici e possono essere applicati su prodotti in cui,

oltre alla vitamina da titolare, siano presenti sostanze che interferiscono con il dosaggio chimico della vitamina stessa.

La tiamina rappresenta un fattore indispensabile per la crescita di molti microrganismi ed i metodi di dosaggio microbiologico si basano appunto sulla valutazione della crescita in rapporto alla quantità di vitamina presente nel terreno di coltura.

Un buon metodo microbiologico di titolazione deve rispondere ai seguenti requisiti:

1) Essere specifico per una data vitamina; il microrganismo impiegato, cioè, non deve essere stimolato né da sostanze diverse dalla vitamina né dalle sue frazioni, isolate o associate.

2) Essere sufficientemente preciso e fornire risultati riproducibili.

3) Richiedere un tempo di incubazione il più possibile breve.

4) Essere di semplice esecuzione e non costoso.

Secondo la nostra esperienza nessuno dei vari metodi finora proposti per il dosaggio della tiamina risponde pienamente a questi requisiti.

Le prime esperienze di dosaggio microbiologico della tiamina furono eseguite da SCHOPFER (¹, ²) su *Phycomyces blakesleeianus*. Il micete veniva coltivato in terreno liquido in matracci e le letture venivano eseguite mediante pesata del velo miceliale. Questo metodo presenta l'inconveniente di richiedere un'incubazione delle colture di almeno 2 settimane; inoltre la crescita del micete è stimolata dalla contemporanea presenza nel terreno di coltura delle due frazioni della vitamina (pirimidinica e tiazolica).

SCHULTZ, ATKIN e FREY (³, ⁴) hanno ideato un metodo basato sulla valutazione della attività fermentativa del lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) in presenza di tiamina. Tale metodo richiede l'uso di un fermentometro appositamente costruito e di un terreno di coltura di laboriosa preparazione; inoltre la frazione pirimidinica della tiamina esercita una azione stimolante sul microrganismo titolatore.

Quest'ultima caratteristica limita anche le applicazioni del metodo di WILLIAMS, McMAHAN e EAKIN (⁵) basato sulla valutazione della crescita di *Saccharomyces cerevisiae* in presenza di vitamina B₁.

NIVEN e SMILEY 1943 hanno usato come microrganismo titolatore *Streptococcus salivarius*, che richiede in maniera specifica la tiamina. Purtroppo il microrganismo cresce a un pH alcalino (7,4) che altera la molecola della vitamina.

Il metodo attualmente più usato è quello basato sull'uso di *Lactobacillus fermentum* 36 A.T.C.C. 9338 (⁶, ⁷). Il metodo è sensibile a 0,01-0,1 mcg di tiamina e non richiede speciali attrezzature; la valutazione del-

la crescita si fa per via turbidometrica o mediante la titolazione dell'acidità svolta. Il tempo di incubazione è di 16-18 ore e il terreno di coltura, alquanto complesso, si trova in commercio già pronto allo stato anidro.

Secondo la nostra esperienza e secondo quella di altri AA. ⁽⁸⁾, il ceppo titolatore va facilmente incontro a variazioni nella esigenza di vitamina: spesso, pur attenendoci scrupolosamente alle istruzioni degli AA, abbiamo osservato nei tubi di controllo privi di vitamina una crescita pari a quella che si sviluppava nei tubi contenenti le concentrazioni più alte di tiamina.

Più recentemente HOFF-JORGENSEN e HANSEN ⁽⁸⁾ hanno utilizzato come microrganismo titolatore il lievito *Kloeckera brevis*. Questo microrganismo esige in maniera specifica l'intera molecola della tiamina e risponde a molti requisiti.

Tuttavia per questo metodo è necessario un terreno di coltura molto complesso e i tubi debbono esser mantenuti in continua agitazione per tutta la durata dell'incubazione.

Un ultimo metodo che vogliamo ricordare è quello basato sulla attività che la tiamina esercita sulla crescita di *Mycobacterium pellegrini*. Ricerche di Lutz ⁽⁹⁾ e nostre (non pubblicate) dimostrano che questo microrganismo è sensibile alla frazione pirimidinica della tiamina, caratteristica che limita l'utilizzazione del metodo ai fini del dosaggio della vitamina.

Il metodo che noi proponiamo si basa sull'utilizzazione di un mutante di *Penicillium chrysogenum* esigente solo e specificamente la tiamina come fattore di crescita. La prova si fa in terreno solido, su piastra, col metodo delle capsule di porcellana.

MATERIALI E MODALITÀ TECNICHE.

1. *Microrganismo titolatore.* - Il mutante di *Penicillium chrysogenum* utilizzato nel presente metodo fu ottenuto dal dott. G. SERMONTI di questo Istituto mediante irradiazione ultravioletta (*P. chrysogenum* Istisan 152).

2. *Conservazione del ceppo.* - Per la conservazione del ceppo è conveniente utilizzare il terreno di Moyer, così composto:

K_2HPO_4	g	1
$MgSO_4$	g	0,5
KCl	g	0,5
$FeSO_4$	g	0,01
Saccarosio	g	30

Corn step liquor	g 10
Agar	g 18
Acqua distillata	cm ³ 1000
pH finale = 7	

Il ceppo va trapiantato ogni 2 settimane. Una buona sporificazione si ottiene anche seminando il micete su chicchi di orzo umettati con una soluzione sporulante (acqua cm³ 1000, asparagina g 1, glicerina g 30) e sterilizzati quindi in autoclave in matracci da 250 cm³ (10-15 g di orzo per matraccio). La temperatura di incubazione è 26°C; una volta ottenuta la sporificazione le colture possono esser conservate in frigorifero a +4°C.

3. *Preparazione della semina.* - Prelevare una adatta quantità di spore e preparare una sospensione il più possibile dispersa in soluzione fisiologica sterile. Ciò si può ottenere mediante pipettamento o meglio ancora impiegando uno stantuffo di materia plastica che si adatti quasi a tenuta in una provetta da batteriologia.

Lavare la sospensione centrifugandola 3 volte in soluzione fisiologica sterile e cambiando ogni volta il liquido soprannatante.

Diluire il sedimento fino ad ottenere una sospensione alquanto torbida (10^6 - 10^7 spore per cm³).

4. *Terreno di prova.* - Si è dimostrato adatto il terreno di Czapek-Dox, cui si aggiunge, prima della sterilizzazione, agar purificato (ad es. Bacto-Agar Difco) nella proporzione dell'1,8%. La composizione è la seguente:

NaNO ₃	g 3
KCl	g 0,5
MgSO ₄ (7H ₂ O)	g 0,5
FeSO ₄ (7H ₂ O)	g 0,01
KH ₂ PO ₄	g 1
Glucosio	g 40
Agar (Difco)	g 18
Acqua distillata	cm ³ 1000
pH finale = 7	

5. *Allestimento della prova.* - La scelta del tipo di piastra è facoltativa, comunque conviene usare piastre a fondo perfettamente piano e di grandi dimensioni, dato che gli aloni di crescita che si ottengono sono di diametro considerevole (v. fig. 1). Noi abbiamo preferito va-

schette di vetro pyrex rettangolari di cm 45 × 35 munite di un coperchio di vetro.

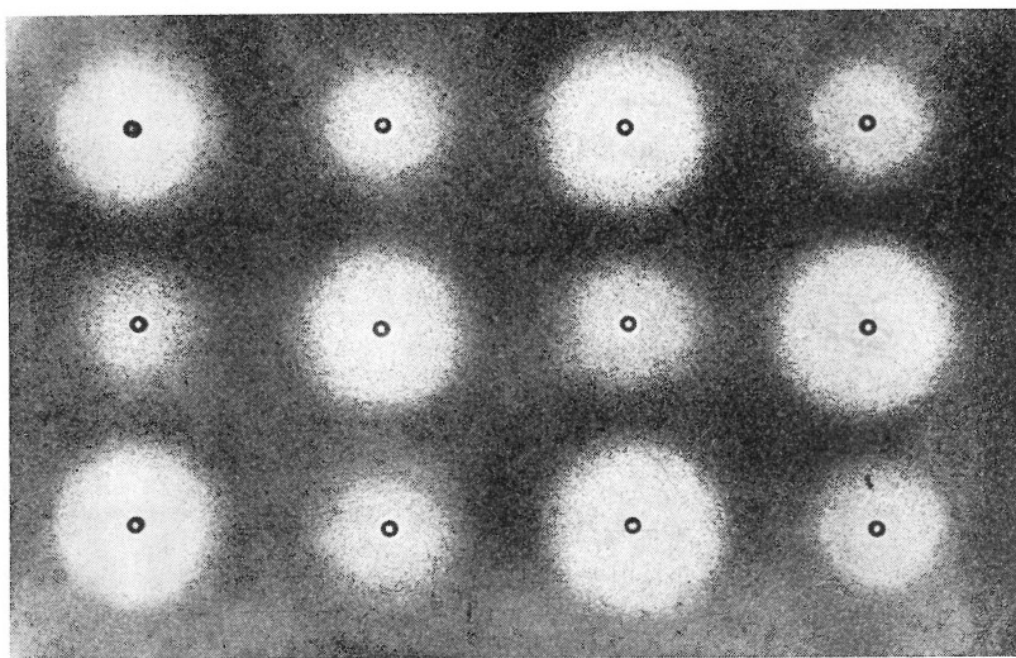


Fig. 1. - Aloni di crescita del mutante *P. chrysogenum* 152.

E' bene assicurarsi, con l'aiuto di una livella, che il fondo della piastra sia perfettamente orizzontale. Sciogliere l'agar; lasciarlo raffreddare a 48°C, aggiungere la sospensione di spore (1 cm³ per ogni 20 cm³ di terreno) e versarlo nelle piastre in modo da avere uno strato uniforme di 4-5 mm di spessore. Date le dimensioni della piastra sarà bene riscaldare leggermente la piastra stessa in precedenza onde ottenere l'uniforme stratificazione dell'agar. Lasciar solidificare l'agar quindi disporre sulla sua superficie, a distanza di 60 mm l'una dall'altra le capsule contenenti le soluzioni.

Portare in termostato a 26°C ed eseguire le letture dopo 48-72 ore.

RISULTATI

1. *Specificità della risposta alla tiamina.* - In esperimenti di dosaggio microbiologico di vitamine, il primo passo consiste nel saggiare la specificità della risposta del ceppo alla sostanza in esame.

A tale scopo abbiamo saggiato le due frazioni della tiamina (*) in

(*) 4-metil-5-(β -ossietil) tiazolo e 2-metil-4-amino-5-aminometil-pirimidina, gentilmente inviati dalla ditta Hoffmann-La Roche di Basilea.

varie dosi e in varie combinazioni tra loro e con la tiamina. I risultati sono riportati nella tabella I.

TABELLA I

	0,1 mcg/cm ³	1 mcg/cm ³	10 mcg/cm ³	100 mcg/cm ³
Tiazolo	—	—	—	—
Pirimidina	—	—	—	—
Tiaz. + pirimid. (1)	—	—	—	—
Tiamina	44	55	68	80
Tiamina + tiaz. + pirimid. (1)	45	55	69	80

(1) le dosi indicate in testa alle colonne si riferiscono a ciascun componente. I numeri indicano il diametro degli aloni in mm.

Dall'esame dei dati riportati nella tabella I risulta che le due frazioni della tiamina non dimostrano attività stimolante né da sole né in associazione. Inoltre l'attività della tiamina non è influenzata dalla contemporanea presenza delle frazioni della vitamina.

Abbiamo anche preso in considerazione la possibilità che altre sostanze diverse dalla tiamina o sue frazioni potessero esplicare attività stimolante sul ceppo da noi impiegato. A tale scopo abbiamo saggiato una serie di vitamine e un idrolizzato di caseina. I risultati sono riportati nella tabella II.

TABELLA II

Sostanze provate	Crescita
Piridossina (0,2 mg/cm ³)	—
Nicotinamide (0,2 mg/cm ³)	—
Calcio pantotenato (0,2 mg/cm ³)	—
Acido folico (0,2 mg/cm ³)	—
Acido paraminobenzoico (0,2 mg/cm ³)	—
Riboflavina (0,2 mg/cm ³)	—
Biotina (0,1 mg/cm ³)	—
Vitamina B ₁₂ (50 mcg/cm ³)	—
Idrolizzato di caseina (50 mg/cm ³)	—
(Vitamin free casamino acids, Difco)	
Idrolizzato di caseina + vitamine	—

In un'altra esperienza è stata saggiata una combinazione della miscela vitamine — idrolizzato di caseina con la tiamina; quest'ultima in due concentrazioni (0,5 e 0,05 mcg/cm³). L'effetto della vitamina B₁ sulla crescita non viene modificato dalla contemporanea presenza delle sostanze provate (v. fig. 2).

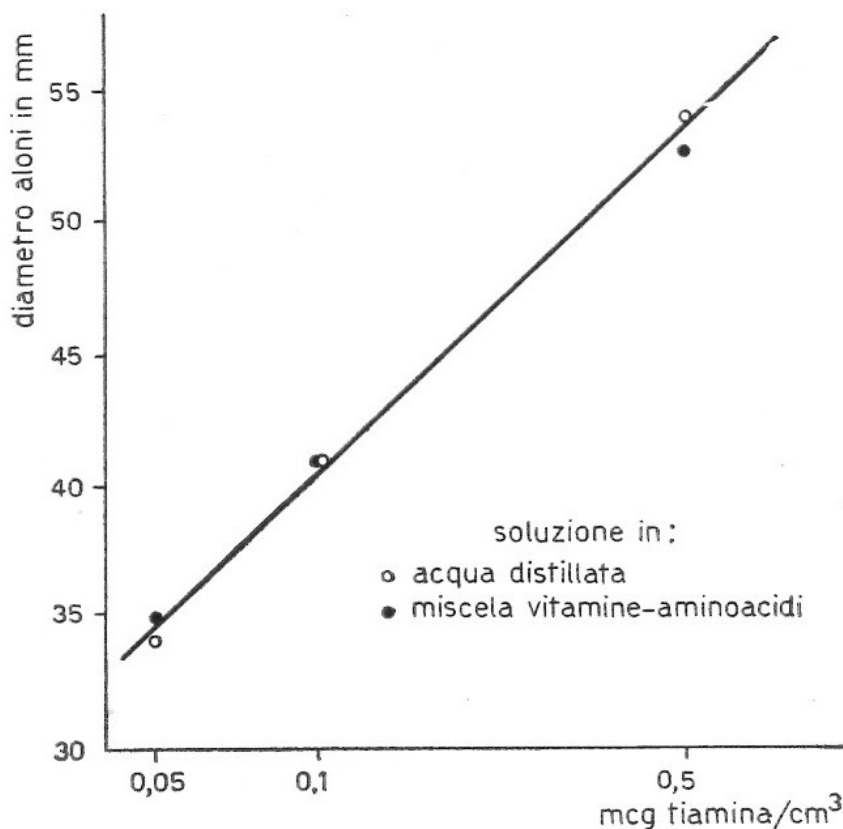


Fig. 2. - Effetto della tiamina in presenza di altre vitamine e di aminoacidi.

2. *Titolazione della tiamina in presenza di antibiotici.* - Talora si presenta la necessità di titolare, con metodi microbiologici, vitamine in presenza di antibiotici. Questo argomento è stato oggetto di un nostro precedente lavoro [PRINCIVALLE e VON LORCH (¹⁰)].

Il mutante *P. chrysogenum* 152 non si è dimostrato sensibile a nessuno dei 6 antibiotici da noi saggiati (penicillina, streptomina, neomicina, cloramfenicolo, tetracilina, clorotetracilina) e l'attività della tiamina non è influenzata dalla contemporanea presenza degli stessi antibiotici.

3. *Curva di taratura.* - Provando uno standard a diverse concentrazioni si ottengono dei valori con i quali è possibile costruire una curva di taratura. Lo studio di tale curva fornisce utili indicazioni per la scelta delle concentrazioni da adottare nella titolazione di un campione

ignoto rispetto ad uno standard: infatti è preferibile che tali concentrazioni siano comprese in un ambito in cui il decorso della curva è rettilineo.

La curva di taratura da noi costruita dimostra che il diametro dell'alone di crescita varia linearmente con il logaritmo della dose nell'ambito compreso tra 0,02 mcg e 1 mcg di tiamina per cm^3 (v. fig. 3).

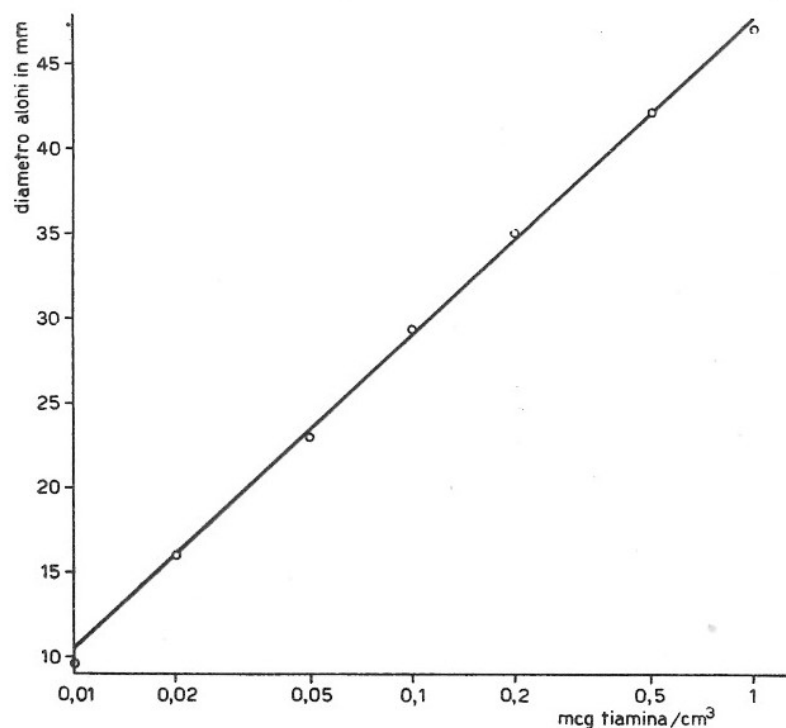


Fig. 3. - Risposta del mutante *P. chrysogenum* 152 alla tiamina.

4. *Titolazione di un campione a concentrazione ignota.* - Il titolo di un campione a concentrazione ignota si ricava dal confronto della attività del campione rispetto all'attività di uno standard. Lo standard e il campione vengono saggiati contemporaneamente nel corso della stessa prova, possibilmente sulla stessa piastra.

Nell'esempio di titolazione che riportiamo la prova è stata compiuta su un'unica piastra usando il metodo cosiddetto « dei 4 punti », in cui vengono saggiate 2 concentrazioni (o punti) per lo standard e 2 concentrazioni per il campione, scelte nell'ambito di linearità della curva.

Le 2 concentrazioni dello standard da noi impiegate contengono rispettivamente 0,5 e 0,05 mcg di tiamina per cm^3 ; è bene che le concentrazioni del campione si avvicinino il più possibile a questi valori. Nel caso che il contenuto in vitamina del campione sia completamente ignoto è opportuno compiere una prova orientativa preliminare.

Per questo dosaggio abbiamo usato una piastra di 35 × 45 cm che ospita 24 capsule alla distanza di 65 mm l'una dall'altra, disposte in 6 « blocchi randomizzati », in ciascuno dei quali figurano i 4 « trattamenti » o concentrazioni in esame. Nella tabella III riportiamo la disposizione dei trattamenti:

TABELLA III

C ₁	S ₁	S ₁	C ₁	S ₂	C ₁
S ₂	C ₂	C ₂	S ₂	C ₂	S ₁
S ₁	C ₁	S ₂	C ₂	S ₁	C ₂
C ₂	S ₂	C ₁	S ₁	C ₁	S ₂

S₁ = Standard, dose alta;
C₁ = Campione, dose alta;

S₂ = Standard, dose bassa;
C₂ = Campione, dose bassa.

In questa disposizione ciascun trattamento compare una sola volta nella stessa colonna (o linea verticale) e in ciascun blocco sono presenti, variamente disposti, i 4 trattamenti. Seguendo questo disegno è possibile ovviare, entro certi limiti, all'eventualità che lo spessore dell'agar non sia uniforme in tutta la piastra.

Nella tabella IV sono riportati i diametri degli aloni ottenuti, le somme dei diametri degli aloni di ciascun blocco, di ogni colonna e di ogni riga di blocchi.

TABELLA IV

56	52	54	59	39	58	
186		194		194		574
38	40	42	39	42	55	
56	59	38	43	53	43	
193		194		192		579
42	36	59	54	58	38	
192	187	193	195	192	194	1153

5. *Calcolo del titolo.* - Nell'intervallo considerato vi è una relazione lineare tra logaritmo delle dosi e diametro degli aloni.

$$\log. \text{ dose} = K \times \text{diametro alone}$$

dove K esprime la pendenza della curva.

Il rapporto tra le due dosi, o titolo, sarà dato dall'equazione:

$$\log. \frac{\text{dose C}}{\text{dose S}} = K (\text{alone C} - \text{alone S})$$

Poiché $\frac{C_1 + C_2}{12}$ esprime il valore medio degli aloni del campione e $\frac{S_1 + S_2}{12}$ il valore medio degli aloni dello standard, sostituendo avremo:

$$\log. \text{ titolo} = K \frac{(C_1 + C_2) - (S_1 + S_2)}{12}$$

K può esser calcolato come incremento del log. della dose con lo aumento del diametro degli aloni; per un incremento delle dosi pari a 10 volte (= R) abbiamo un incremento degli aloni pari a:

$$\frac{C_1 + S_1}{12} - \frac{C_2 + S_2}{12} \quad \text{quindi}$$

$$K = \frac{\log. R}{\frac{(C_1 + S_1) - (C_2 + S_2)}{12}}$$

Da cui si può calcolare:

$$\log. \text{ titolo} = \log. R \frac{(C_1 + C_2) - (S_1 + S_2)}{(C_1 + S_1) - (C_2 + S_2)}$$

Sostituendo i valori medi

$$\log. \text{ titolo} = \log. 10 \times \frac{(394 + 252) - (324 + 228)}{(349 + 324) - (252 + 228)} = \frac{49}{193} = 0,254$$

$$\text{Titolo} = \text{antilog. } 0,254 = 1,79$$

Il che significa che la concentrazione del campione è 1,79 volte quella dello standard.

6. *Analisi della varianza.* - I valori riportati nella tabella IV permettono l'analisi della varianza. Nella tabella V sono calcolate le varianze totali, fra blocchi, fra trattamenti fra colonne e fra righe di blocchi.

TABELLA V

Origine della variazione	Devianza	Gradi di libertà	Varianza
Totale	1681,0	23	560,3
Fra trattamenti	1632,2	3	544,1
Fra blocchi	12,2	5	2.500
Fra colonne	9,7	5	1.940
Fra righe di blocchi	1,0	1	1.000
Errore (residuo)	25,9	9	2,877

Nelle condizioni ideali la variazione dovrebbe essere esclusivamente rappresentata dalle differenze fra i trattamenti, restano il più possibile limitate le variazioni dovute ad altre cause.

In effetti nel nostro caso la variazione ha origine in modo preponderante dalla differenza fra trattamenti, e le altre variazioni hanno valori inferiori a quello del residuo.

Il parallelismo è quasi perfetto, infatti secondo l'attesa ($C_1 - C_2$) dovrebbe essere uguale a ($S_1 - S_2$) e i due valori risultano rispettivamente 97 e 96 mm.

7. *Calcolo dell'errore del titolo.* - Posto che:

$$a = (C_1 + C_2) - (S_1 + S_2)$$

$$b = (C_1 + S_1) - (C_2 + S_2)$$

$$s^2 = \text{varianza del residuo}$$

$$N = (C_1 + C_2 + S_1 + S_2)$$

l'errore standard (S_m) del logaritmo del titolo è dato da

$$S_m = \sqrt{s^2} \times \sqrt{\frac{b^2 + a^2}{\frac{N}{N}}} = \frac{b^2}{N}$$

Esso risulta uguale a 0,0443, e pertanto:

$$\log. \text{ titolo} = 0,294 \pm 0,0443$$

Poiché la stima di una media, più o meno la stima dell'errore standard della media stessa comprende con probabilità di due terzi il valore reale della media, il logaritmo del titolo sarà, con detta probabilità, compreso tra limiti di 0,2985 e 0,2095 e quindi il titolo sarà compreso fra 1,97 e 1,62. Il che significa che l'errore è di circa il 10%.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SCHOPFER W. H. - Arch. Mikrobiol., 5: 511 (1934).
 - (²) SCHOPFER W. H. e JUNG A. - Ac. Sc., 204: 1500 (1937).
 - (³) SCHULTZ A. S., ATKIN L. e FREY C. N. - J. Bact., 40: 339 (1940).
 - (⁴) SCHULTZ A. S., ATKIN L. e FREY C. N. - Ind. and eng. Chem. Anal. Ed., 14: 35 (1942).
 - (⁵) WILLIAMS R. J., McMAHAN J. R. e EAKIN R. E. - Univ. Texas Pub., 4137: 31 (1941).
 - (⁶) SARETT H. P. e CHELDELIN V. H. - J. biol. Chem., 155: 453 (1944).
 - (⁷) CHELDELIN V. H., BENNETT M. J. e KORNBERG H. A. - J. biol. Chem., 166: 779 (1946).
 - (⁸) HOFF-JORGENSEN E. e HANSEN B. - Acta chem. scand., 9: 562 (1955).
 - (⁹) LUTZ A. - Ann. Inst. Pasteur, 73: 1089 (1947).
 - (¹⁰) PRINCIVALLE M. e VON LORCH L. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 20: 32 (1957).
-