

47. Mario PRINCIVALLE. — Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B - II. Titolazione della vitamina B₆.

Riassunto. — Viene descritto un metodo per la titolazione della vitamina B₆ mediante *Neurospora sitophila* in terreno solido. Il diametro degli aloni di crescita varia linearmente col logaritmo della dose nello ambito compreso tra mcg 0,05 e mcg 10 di piridossina per cm³.

Il periodo di incubazione è di 24 ore.

Résumé. — On décrit une méthode pour le titrage de la vitamine B₆ au moyen de la *Neurospora sitophila* dans un milieu solide. Le diamètre des halos de croissance, varie d'une façon linéaire avec le logarithme de la dose dans les mesures comprises entre mcg 0,05 et mcg 10 de pyridoxine pour cm³.

La période d'incubation est de 24 heures.

Summary. — A method is described for the assay of vitamin B₆ using *Neurospora sitophila* on a solid medium. The diameter of the halos of growth varies linearly with the logarithm of the dose in the range 0.05 - 10 µg of pyridoxine per ml.

The period of incubation is of 24 hrs

Zusammenfassung. — Eine Methode zur Bestimmung des Vitamins B₆ mit *Neurospora sitophila* auf festem Nährboden wird geschildert. Der Durchmesser der Wachstumsringe wächst linear mit dem Logarithmus der Dose für Konzentrationen von 0,05 bis 10 mcg/cm³ Piridoxin.

Die Inkubation dauert 24 Stundem.

Per il dosaggio microbiologico della vitamina B₆ sono da preferirsi i metodi che permettono la determinazione delle tre forme, (piridossina, piridossale e piridossamina), nelle quali la vitamina B₆, o più propriamente il gruppo o complesso B₆, è attiva per gli animali superiori.

Rispondono a questo requisito, e sono pertanto più comunemente usati, soprattutto due metodi: quello di ATKIN, SCHULTZ, WILLIAMS e FREY ⁽¹⁾, basato sull'uso del lievito *Saccharomyces carlsbergensis*, e quello di STOKES, LARSEN, WOODWARD e FOSTER ⁽²⁾, che si vale di un mutante di *Neurospora sitophila*.

Con l'uso di *Lactobacillus casei* e di *Streptococcus faecalis* è invece

possibile titolare rispettivamente il piridossale e la piridossamina (³, ⁴).

Nel metodo che utilizza la *Neurospora* descritto da STOKES e coll. e modificato da BARTON-WRIGHT (⁵), la titolazione viene effettuata su terreno liquido in matraccini in cui la *Neurospora* cresce formando in superficie un velo miceliale più o meno spesso in rapporto alla concentrazione in vitamina. La lettura dei risultati viene eseguita dopo 5 giorni di incubazione a 30°C, mediante pesata dei veli miceliali.

Il metodo che noi proponiamo consiste nell'utilizzare per la titolazione lo stesso ceppo di *Neurospora* (*N. Sitophila* 299, ATCC 9276) effettuando la prova col metodo delle capsule di porcellana su terreno all'agar.

PROCEDIMENTO

1. *Conservazione del ceppo.* - Il ceppo di *Neurospora* viene conservato in collezione mediante trapianti settimanali in un terreno così costituito:

Estratto di lievito	g	4
Maltosio	g	40
Proteose peptone (Difco)	g	4
Agar	g	15
Acqua	cm ³	1000

pH 6,8 sterilizzare a 120°C e far solidificare in provette a becco di clarino.

2. *Preparazione della semina.* - Prelevare 2 ansate di spore da una coltura di 48 ore in terreno completo. Sospendere le spore in soluzione fisiologica e lavarle 2 volte per centrifugazione; dopo l'ultimo lavaggio risospendere il sedimento in 10 cm³ di soluzione fisiologica.

3. *Terreno di prova.* - Abbiamo avuto risultati soddisfacenti usando il terreno descritto da BARTON-WRIGHT così modificato:

Saccarosio	g	15
Tartrato di ammonio	g	5
Citrato monosodico	g	2
Fosfato monopotassico	g	2,5
Solfato di magnesio	g	0,5
Cloruro di sodio	g	0,1
Cloruro di calcio	g	0,1

Solfato di zinco	g	0,002
Biotina	mcg	6
Agar purificato e lavato	g	18
Acqua distillata	cm ³	1000
pH finale		6,8

4. *Allestimento della prova.* - Nelle nostre prove abbiamo usato piastre di vetro pyrex rettangolari, di cm 22 × 23 che ospitavano 24 capsuline di porcellana a distanza di 50 mm l'una dall'altra.

Le piastre avevano il fondo perfettamente piano, e, con l'aiuto di una livella venivano disposte perfettamente orizzontali.

Sciogliere l'agar, lasciarlo raffreddare a 48°C, aggiungere la sospensione di semina nella proporzione di 1 cm³ ogni 20 cm³ di terreno. Versare l'agar-spore sulla piastra in modo da avere uno strato uniforme di 3-4 mm di spessore; lasciar solidificare.

Allo scopo di impedire uno sviluppo troppo abbondante di micelio aereo e di ottenere aloni a margini più netti, è consigliabile coprire lo strato di agar-spore con un secondo strato di agar fuso e raffreddato a 48°C non contenente spore.

Una volta solidificato il secondo strato, deporre le capsuline e portare in termostato a 30°C per 24 ore. L'incubazione per un periodo più lungo altera i risultati.

RISULTATI

1. *Curva di taratura.* - La curva di taratura da noi costruita dimostra che il diametro dell'alone di crescita varia linearmente col logaritmo della dose nell'ambito compreso tra 0,05 e 10 mcg di piridossina per cm³ (V. fig. 1).

2. *Titolazione di un campione a concentrazione ignota.* - Le nostre prove sono state eseguite su un'unica piastra usando il metodo cosiddetto « dei 4 punti », in cui vengono saggiate 2 concentrazioni per lo standard e 2 concentrazioni per il campione da titolare. Le varie concentrazioni vengono deposte sulla piastra seguendo la disposizione a « blocchi randomizzati », con un procedimento analogo a quello da noi adottato per la titolazione della tiamina mediante *Penicillium chrysogenum* 152⁽⁶⁾, differendo solo nelle dimensioni della piastra e nella distanza tra le capsuline. I punti o concentrazioni adottati per lo standard sono 0,2 e 2 mcg per cm³.

Il calcolo del titolo di un campione ignoto e il calcolo dell'errore

del titolo sono stati eseguiti mediante lo stesso procedimento già descritto nel succitato lavoro: l'errore è compreso nell'ambito di $\pm 10\%$.

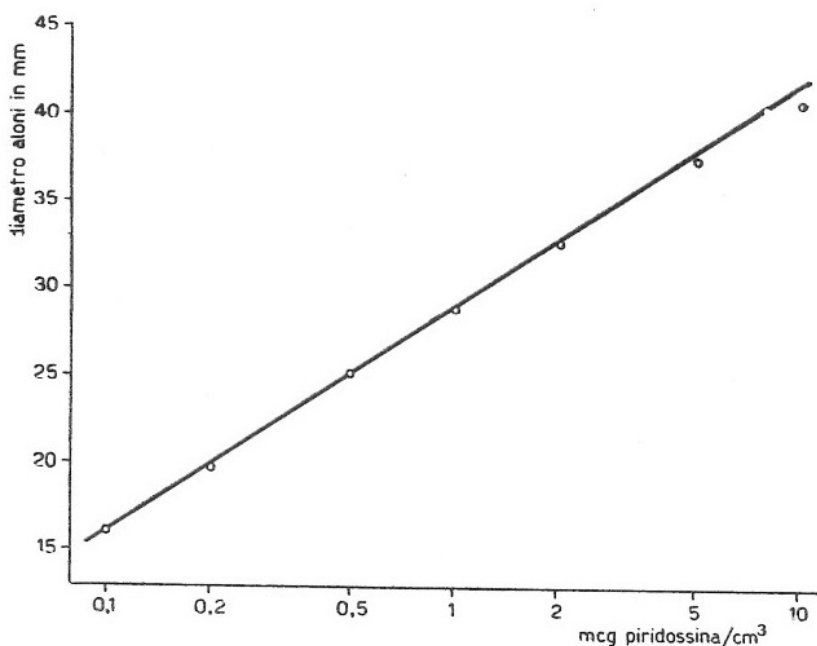


Fig. 1. - Risposta di *N. Sitophila* 299 alla piridossina in terreno solido.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il metodo da noi descritto presenta a nostro parere alcuni vantaggi rispetto al metodo di STOKES e coll.:

1) Il tempo di incubazione è considerevolmente abbreviato (da 5 giorni a 24 ore).

2) L'allestimento della prova è di più semplice esecuzione e richiede l'impiego di minor quantità di materiali.

3) La lettura dei risultati viene eseguita più semplicemente e più rapidamente attraverso la misurazione degli aloni di crescita, eliminando la sterilizzazione, l'essiccamento e la pesata dei veli miceliali.

Il metodo si applica in un ambito di concentrazione leggermente superiori a quelle usate nei metodi di Stokes e coll. e di Barton-Wright (0,2-2 mcg invece di 0,1-1 mcg). Tali concentrazioni sono state scelte per comodità di lettura. Tuttavia, qualora fosse necessario eseguire dosaggi su materiali a più basso contenuto di vitamina B₆, possono esser

usate concentrazioni nell'ambito compreso tra 0,05 e 0,5 mcg per cm³, con leggero scapito della nettezza degli aloni alle concentrazioni più basse.

L'A. ringrazia la Sig.na ELENA SPAGNOLETTO per la collaborazione tecnica.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ATKIN L., SCHULTZ A. S., WILLIAMS W. L., FREY C. N. - Ind. and eng. Chem. Anal. Ed., 15: 141 (1943).
 - (²) STOKES J. L., LARSEN A., WOODWARD C. R., FOSTER J. W. - J. biol. Chem., 150: 17 (1943).
 - (³) RABINOWITZ J. C., MONDY N. I., SNELL E. E. - J. biol. Chem., 175: 147 (1948).
 - (⁴) RABINOWITZ J. C., SNELL E. E. - J. biol. Chem., 176: 1157 (1948).
 - (⁵) BARTON-WRIGHT E. C. - Analyst, 70: 283 (1945).
 - (⁶) PRINCIVALLE M. - Rend. Istituto Sup. Sanità.
-