

67. Mario PRINCIVALLE. — Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B. - IV. Titolazione dell'acido p-aminobenzoico.

Riassunto. — Per la determinazione microbiologica dell'acido p-aminobenzoico viene proposto un metodo che utilizza un mutante di *Aspergillus nidulans*.

La titolazione viene eseguita in terreno solido, col metodo delle capsule di porcellana; le concentrazioni ottimali dello standard sono comprese tra 0,2 e 2 mcg di APAB per cm³.

Résumé. — Pour la détermination de l'acide p-aminobenzoïque on propose une méthode qui utilise une mutante de *Aspergillus nidulans*.

Le dosage est effectué sur milieu gélosé, par la méthode des capsules de porcelaine; les concentrations optimales sont comprises entre 0,2 et 2 µg de A.P.A.B. pour cm³.

Summary. — A method using a mutant of *Aspergillus nidulans* is proposed for the microbiological assay of p-aminobenzoic acid.

The determination is made on a solid medium using the porcelain cups method. The optimal concentrations for the standard lie within 0.2 and 2 µg of PABA/ml.

Zusammenfassung. — Zur mikrobiologischen Titrierung der p-Aminobenzoesäure wird eine Methode vorgeschlagen in der ein Mutant von *Aspergillus nidulans* verwendet wird.

Die Titrierung wird auf festem Nährboden nach dem Verfahren der Porzellankapseln durchgeführt; die optimalen Konzentrationen des Standards befinden sich zwischen 0,2 und 2 mcg APAB pro cm³.

Per il dosaggio microbiologico dell'acido p-aminobenzoico (APAB) si conoscono vari metodi in cui vengono utilizzati microrganismi che richiedono questa sostanza come fattore di crescita indispensabile.

Il primo metodo di determinazione microbiologica dell'APAB è stato proposto da LANDY e DICKEN ⁽¹⁾ che si servirono di *Acetobacter suboxydans*; il metodo più generalmente usato è quello di AGARWALA e PETERSON ⁽²⁾ basato sull'uso di un mutante di *Neurospora crassa* che richiede l'APAB.

Altri metodi descritti utilizzano il *Lactobacillus arabinosus* [LEWIS ⁽³⁾] e il *Clostridium acetobutylicum* [HOUSEWRIGHT e KOSER ⁽⁴⁾].

I metodi che abbiamo elencato sono tutti estremamente sensibili, in quanto sono capaci di dosare quantità di APAB che variano da 0,0001 a 0,01 mcg, ma presentano alcuni svantaggi che ne limitano in qualche caso l'applicazione.

La specificità della risposta all'APAB è messa in dubbio per quanto riguarda il *Lactobacillus arabinosus* [SARETT (5) ha dimostrato che la crescita di questo microrganismo è promossa dall'acido folico in assenza di APAB] e per quanto riguarda la *Neurospora crassa*, la cui crescita sarebbe, secondo STREHLER (6), promossa anche dalla metionina.

Tutti i metodi, inoltre, richiedono terreni di coltura piuttosto costosi o accorgimenti tecnici complessi (p. es. colture in anaerobiosi per il *Clostridium acetobutylicum*), o un protratto periodo di incubazione (3-5 giorni per la *Neurospora crassa*).

Il metodo che noi proponiamo si basa sull'uso di un mutante di *Aspergillus nidulans* che richiede come fattore di crescita solo e specificamente l'APAB. La prova viene eseguita in terreno solido col metodo delle capsule di porcellana.

MATERIALI E MODALITÀ TECNICHE

1) MICRORGANISMO TITOLARE. — Il mutante di *Aspergillus nidulans* utilizzato nel presente metodo fu isolato dal Dr. G. Sermoniti di questo Istituto mediante irradiazione ultravioletta (*A. nidulans* Istisan P₇).

2) MANTENIMENTO DEL CEPPLO. — Il terreno più conveniente è quello di Moyer così composto:

K ₂ HPO ₄		g	1
MgSO ₄		»	0,5
KCl		»	0,5
FeSO ₄		»	0,01
Saccarosio		»	30
Corn step liquor		»	10
Agar		»	18
Acqua distillata		cm ³	1000

pH finale = 7

Il ceppo viene trapiantato ogni due settimane. Una buona sporificazione si ottiene coltivando il micete su chicchi d'orzo umettati con una

soluzione sporulante (acqua cm³ 1000, asparagina g 1, glicerina g 30) e sterilizzati in autoclave in matracci da 250 cm³ (10-15 g d'orzo per matraccio).

La temperatura d'incubazione è 37°C.

3) PREPARAZIONE DELLA SEMINA. — La sospensione di spore da usarsi per la semina può esser preparata in maniera soddisfacente da una coltura ben sporificata del micete su chicchi d'orzo: alla coltura si aggiungono 50-100 cm³ di soluzione fisiologica sterile, si agita energicamente per qualche minuto, quindi si filtra il liquido attraverso alcuni strati di garza sterile. La sospensione così ottenuta si può conservare per diverse settimane in frigorifero a +4°C.

Al momento della prova si preleva un certo volume della sospensione, si lavano le spore per centrifugazione e si diluiscono fino ad ottenere una leggera torbidità.

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) e lavato, nella proporzione dell'1,8%.

La composizione è la seguente:

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

pH finale = 7

5) ALLESTIMENTO DELLA PROVA. — Nelle nostre esperienze abbiamo usato piastre rettangolari di vetro Pyrex di cm 22 × 33 che ospitavano 24 capsule di porcellana a distanza di 50 mm l'una dall'altra.

Sciogliere l'agar, lasciarlo raffreddare a 48°C, aggiungere la sospensione di spore (1 cm³ ogni 20 cm³ di terreno) e versarlo nelle piastre in modo da avere uno strato uniforme di 4-5 mm di spessore. Lasciar solidificare l'agar, quindi disporre sulla sua superficie, a distanza di 50 mm l'una dall'altra, le capsule contenenti le soluzioni di APAB. Portare in termostato a 37°C. Le letture si eseguono dopo 24-36 ore.

RISULTATI

1) SPECIFICITÀ DELLA RISPOSTA ALL'APAB.

Il ceppo da noi usato richiede l'APAB in maniera specifica, infatti questa sostanza non può essere sostituita da nessuna delle vitamine del gruppo B.

Per stabilire questo dato abbiamo saggiato il ceppo con diverse sostanze riportate nella tabella 1.

TABELLA 1

Sostanze provate		Effetto sulla crescita
Piridossina	(0,2 mg/cm ³)	—
Nicotinamide	» »	—
Riboflavina	» »	—
Tiamina	» »	—
Calcio pantotenato	» »	—
Acido folico	» »	—
Biotina	» »	—
Vitamina B ₁₂	(50 mcg/cm ³)	—
Idrolizzato di caseina	(20 mg/cm ³)	—
(Vitamin free casaminoacids, Difco) .		
Idrolizzato di caseina + vitamine . .		—

L'acido folico e la metionina sono state saggiate anche separatamente, senza che si sia rilevato alcun effetto sulla crescita, nelle dosi rispettive di 1 mg e 5 mg/cm³.

In un'altra esperienza è stata saggiata una combinazione della miscela vitamine-idrolizzato di caseina con l'APAB; quest'ultimo in due concentrazioni (0,5 e 5 mcg/cm³).

L'effetto dell'APAB sulla crescita non viene modificato dalla contemporanea presenza delle sostanze provate.

Gli acidi orto- e meta-aminobenzoico, in concentrazione di 100 mcg/cm³ non hanno dimostrato alcun effetto.

2) CURVA DI TARATURA

La curva di taratura da noi costruita dimostra che nelle condizioni del nostro esperimento il diametro dell'alone di crescita varia linearmente col logaritmo della dose nell'ambito compreso tra 0,05 e 5 mcg di APAB per cm^3 (V. fig. 1).

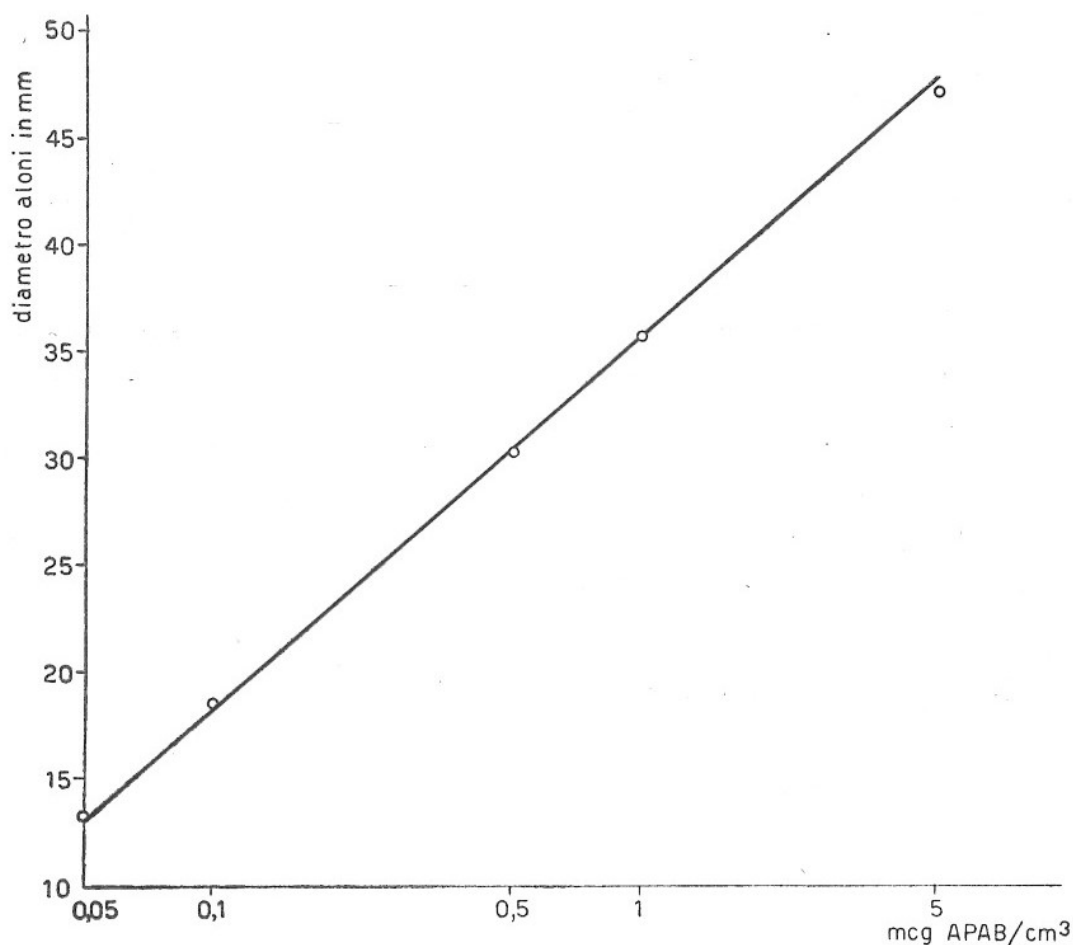


Fig. 1. - Risposta dell'*Aspergillus nidulans* P₇ all'acido p-aminobenzoico.

3) TITOLAZIONE DI UN CAMPIONE A CONCENTRAZIONE IGNOTA.

Le nostre prove sono state eseguite su un'unica piastra, usando il metodo dei « 4 punti », in cui vengono saggiate due concentrazioni dello standard e due concentrazioni del campione da titolare. Le varie concentrazioni vengono disposte sulla piastra seguendo la disposizione a blocchi randomizzati.

Il procedimento è analogo a quello da noi adottato per la titolazione della tiamina mediante *Penicillium chrysogenum* 152 (7), differendo solo nelle dimensioni della piastra e nella distanza tra le capsule.

I punti o concentrazioni dello standard sono 0,2 e 2 mcg di APAB per cm³.

Il calcolo del titolo di un campione ignoto e il calcolo dell'errore del titolo sono stati eseguiti mediante lo stesso procedimento seguito nel succitato lavoro: l'errore è compreso nell'ambito di $\pm 10\%$.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il metodo proposto è utile per la titolazione dell'APAB in materiali liquidi che lo contengano in concentrazioni superiori ai mcg 0,2 per cm³, o in materiali solidi da cui si possa ricavare una soluzione acquosa della concentrazione suindicata.

In tali condizioni il metodo che descriviamo si è dimostrato sotto molti aspetti preferibile ai metodi già in uso, in quanto la titolazione è di semplice esecuzione, economica e altamente specifica per l'APAB; inoltre può essere eseguita in presenza dei comuni agenti antibiotici e farmacoterapici antibatterici. In particolare ne abbiamo sperimentato a lungo l'utilità nella titolazione dell'APAB contenuto nei prodotti farmaceutici in presenza o meno di altre vitamine, di aminoacidi, di antibiotici e di sulfamidici.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) LANDY M., DICKEN D. M. - J. Biol. Chem. 146: 409 (1942).
 - (²) AGARWALA S. C., PETERSON W. H. - Arch. Biochem., 27: 304 (1950).
 - (³) LEWIS J. C. - J. Biol. Chem., 146: 444 (1942).
 - (⁴) HOUSEWRIGHT H. D., KOSER S. A. - J. Infect. Disease, 73: 443 (1944).
 - (⁵) SARETT H. P. - J. Biol. Chem., 174: 265 (1947).
 - (⁶) STREHLER B. L. - J. Bact., 59: 403 (1950).
 - (⁷) PRINCIVALLE M. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 21: 701 (1958).
-