

7. M. PRINCIVALLE e Maria F. MASTROPIETRO-CANCELLIERI. — Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B. — V. Titolazione della tiamina (vit. B₁) mediante l'impiego di un analogo inibente (piritiamina).

Riassunto. — Il metodo descritto si basa sulla possibilità di riattivare, mediante la tiamina, la crescita di un ceppo di *Bacillus subtilis* inibito da un analogo della vitamina stessa ad azione antimetabolica: la neo-piritiamina.

La titolazione si effettua in terreno minimo di Davis, solido e con il metodo delle capsule di porcellana.

Il diametro degli aloni di crescita varia linearmente con il logaritmo delle dosi nell'ambito compreso tra mcg 0,025/cm³ e mcg 0,5/cm³.

La determinazione può essere effettuata nel medesimo terreno di Davis liquido, e in tal caso la sensibilità alla tiamina è 100 volte maggiore (0,0002 mcg).

Si dimostra la specificità della risposta alla tiamina.

Summary. — The method described is based on the reactivation with thiamine of a strain of *Bacillus subtilis*, whose growth is inhibited with neo-pyritiamine, an analogue of the vitamin with antimetabolic properties.

The diameter of the growth zones is in linear variation to the logarithm of the dose, within the limits of mcg 0,025/ml to mcg 0,5/ml.

The specificity of the response to thiamine is demonstrated.

In un precedente lavoro sul dosaggio microbiologico della tiamina mediante un mutante di *Penicillium chrysogenum* ⁽¹⁾ sono stati esposti i vari metodi di titolazione che impiegano diversi microrganismi richiedenti tiamina per la crescita. Il metodo esposto nel citato lavoro si è dimostrato adatto allo scopo per quanto riguarda la specificità e la sensibilità; tuttavia la necessità di un periodo d'incubazione piuttosto lungo (72 ore) e il fatto che nel terreno solido, da noi usato, compaiono aloni di grande diametro che obbligano ad usare piastre di grandi dimensioni, ci ha spinti a proseguire le ricerche per mettere a punto un metodo che unisse i vantaggi della specificità e sensibilità a quelli di una maggiore praticità.

Pertanto abbiamo considerato la possibilità di applicare al dosaggio della tiamina un procedimento già utilizzato da CANCELLIERI e MORPURGO ⁽²⁾ per la titolazione microbiologica degli aminoacidi.

Tale metodo rappresenta un'applicazione pratica di alcune nozioni già acquisite nel campo dell'antagonismo biologico: in particolare si basa sulla possibilità di riattivare, mediante un determinato composto (in questo caso la tiamina), la crescita di un microrganismo inibito da un analogo di tale composto ad azione antimetabolica.

TABELLA 1

Azione di tre derivati della tiamina sulla crescita di alcune specie microbiche.

Ceppo batterico	Acetiltiamina	Piritiamina	Ossitiamina
<i>Azotobacter vinelandi</i> B1	—	+	+
<i>Bacillus brevis</i> B4	—	—	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B5	—	+	—
<i>Lactobacillus brevis</i> B7	—	++	+++
<i>Bacillus cereus</i> B17	—	++	++
<i>Bacillus subtilis</i> B13	—	—	++
<i>Bacillus subtilis</i> B20	—	++	—
<i>Salmonella typhimurium</i>	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> B25	—	++++	—
<i>Escherichia coli</i> B27	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> B35	—	+++	++
<i>Aerobacter aerogenes</i> B41	—	+	++
<i>Corynebacterium xerosis</i> B78	—	++	—

Il segno + indica il grado d'inibizione prodotto dalle relative sostanze su ciascun ceppo batterico.

E' stata saggiata l'attività inibente dell'acetiltiamina, della neopiritiamina e dell'ossitiamina su diversi ceppi batterici.

Nella tabella 1 sono riportati i risultati di tale esperienza. Da essa risulta che l'acetiltiamina non è attiva nell'inibire la crescita dei microrganismi esaminati. La piritiamina e l'ossitiamina sono attive, la prima generalmente in maggior misura della seconda.

Tra i ceppi batterici inibiti dalla piritiamina, sono stati scelti alcuni più sensibili (vedi tabelle 1 e 2). Questi ceppi sono stati seminati in terreno minimo di Davis, contenente concentrazioni scalari di piritiamina e su di essi è stata saggiata la riattivazione della crescita da parte della tiamina, della frazione pirimidinica (2-metil-4-amino-5-metilsolfon-pirimidina; MAMP) e della frazione tiazolica (4-metil-5 β -ossietil-tiazolo; MOT) (1). I risultati figurano nella tabella 2.

TABELLA 2

Riattivazione della crescita di alcuni batteri, inibiti da diverse concentrazioni di piritiamina, da parte della tiamina e dei suoi residui pirimidinico e tiazolico.

Ceppo batterico	Concentrazioni di piritiamina pe. cm ³ di terreno	Tiamina	MAMP	MOT
B17	0,0005 M	—	—	—
	0,00025 M	—	—	—
	0,00005 M	+	—	+
	0,000025 M	++	—	++
B20	0,0005 M	—	—	—
	0,00025 M	—	—	—
	0,00005 M	+	—	+
	0,000025 M	++	—	++
B25	0,0005 M	—	—	—
	0,00025 M	—	—	—
	0,00005 M	+	—	—
	0,000025 M	++	—	—
B35	0,0005 M	—	—	—
	0,00025 M	—	—	—
	0,00005 M	+	—	—
	0,000025 M	++	—	—

In particolare abbiamo individuato un ceppo di *Bacillus subtilis* che viene inibito dalla piritiamina e riattivato dalla molecola integra della tiamina. Abbiamo così creduto opportuno di utilizzare il ceppo di *Bacillus subtilis* suddetto per il dosaggio microbiologico della tiamina.

MATERIALI E MODALITA' TECNICHE

1. - MICRORGANISMO. — E' un ceppo di *Bacillus subtilis* della nostra collezione, isolato dall'aria. Il suo numero di collezione è B25 e viene conservato per trapianti bimensili in agar-brodo.

(1) La 2-metil-4-amino-5-metilsolfon-pirimidina e il 4-metil-5 β -ossietil-tiazolo sono stati gentilmente inviati dalla ditta Hofmann-La Roche di Basilea.

2. - PREPARAZIONE DELLA SEMINA. — La sensibilità del ceppo alla tiamina è diversa a seconda che esso sia nella forma vegetativa o sporicata: in questa ultima fase la sensibilità è molto maggiore. Pertanto è bene eseguire le titolazioni usando una sospensione di spore, preparata nel seguente modo: si sospende in soluzione fisiologica la patina di un'agar-coltura di 4-5 giorni; tale sospensione viene riscaldata a 70°C in bagnomaria per 15 min., in modo da uccidere le forme vegetative presenti. Si lava per centrifugazione e si risospende in soluzione fisiologica. E' bene determinare la concentrazione finale che dovrà essere di circa 10^8 spore per cm^3 .

La sospensione così ottenuta è conservata a + 4°C per un tempo praticamente indefinito, il che consente di poter eseguire una titolazione in qualunque momento senza ricorrere ogni volta alla subcoltura e al lavaggio del ceppo per la semina.

3. - TERRENO DI PROVA. — E' il terreno di Davis, reso solido mediante agar, così costituito: K_2HPO_4 g 7; KH_2PO_4 g 3; Na_3 -citrato. $3\text{H}_2\text{O}$ g 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g 0,1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ g 1; glucosio g 2; agar (Difco) g 15; H_2O bidistillata a 1000 cm^3 ; pH7.

4. - ALLESTIMENTO DELLA PROVA. — All'agar sciolto e raffreddato a 45°C si aggiunge la sospensione di semina già descritta in ragione del 5% in volume (6×10^6 cellule/ cm^3 di agar), nonché lo 0,66% di una soluzione di piritiamina 10^{-6} M (ottenuta sciogliendo mg 0,42 di piritiamina (1) in 1 litro di acqua distillata).

Si versa l'agar-germi-piritiamina in piastre (di dimensioni variabili a seconda del numero di campioni da titolare) in modo da ottenere uno strato di circa 4 mm, si lascia solidificare. Si depongono sulla superficie i cilindretti di porcellana con le varie diluizioni di tiamina e poi si porta in termostato a 37°C per 18-24 ore.

RISULTATI

1. - SPECIFICITA' DELLA RISPOSTA ALLA TIAMINA. — Come primo esperimento abbiamo saggiato le due frazioni della tiamina (4-metil-5 β -ossietil-tiazolo e 2-metil-4-amino-5-metil-pirimidina) a varie dosi e in varie combinazioni tra loro e con tiamina. I risultati sono riportati nella tabella 3.

(1) La piritiamina (neo-piritiamina) è reperibile presso la *California Foundation for Biochemical Research*.

TABELLA 3

Riattivazione della crescita del ceppo B25, in presenza di piritiagina, da parte della tiamina e dei suoi miscugli con i residui pirimidinico e tiazolico.

	0,1 mcg/cm ³	1 mcg/cm ³	10 mcg/cm ³
MOT	—	—	—
MAMP	—	—	—
MOT + MAMP (1)	—	—	—
Tiamina	22.5	33.2	44.0
Tiamina + MOT + MAMP (1)	23.0	34.0	44.6

(1) Le dosi indicate in testa alla colonna si riferiscono a ciascun componente. I numeri indicano il diametro degli aloni in mm.

Dall'esame dei dati riportati nella tabella 1 risulta che le due frazioni della tiamina non esercitano attività stimolante nè da sole nè in associazione; inoltre l'attività della tiamina non è influenzata dalla contemporanea presenza delle frazioni della vitamina.

Abbiamo poi preso in considerazione altre sostanze, diverse dalla tiamina o sue frazioni, che potessero esplicare attività riattivante sul no-

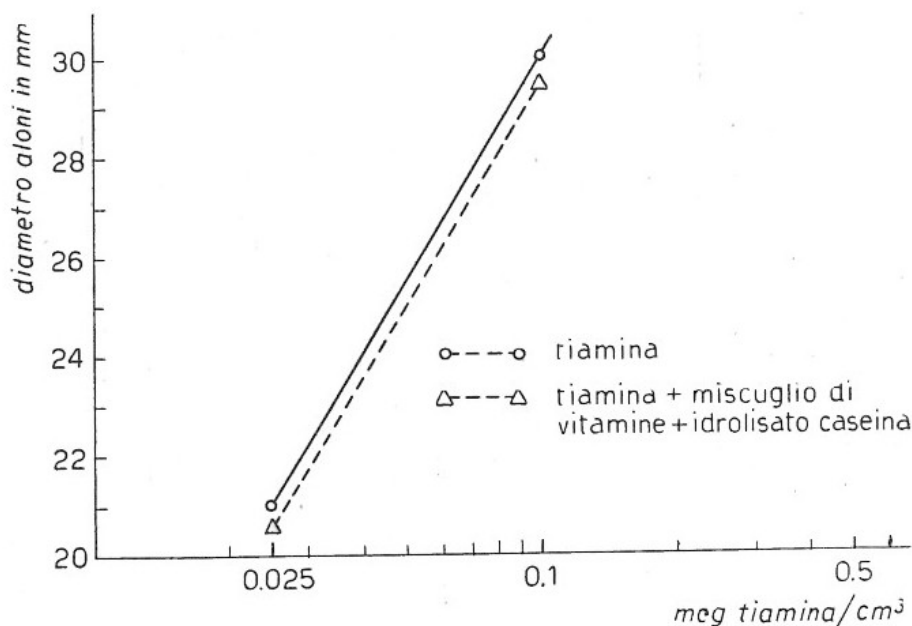


Fig. 1. - Dosaggio della tiamina in presenza di un complesso di vitamine e di aminoacidi. Sull'asse delle ascisse, logaritmo delle concentrazioni di tiamina in mcg/cm³, sull'asse delle ordinate diametri degli aloni di crescita in mm.

stro ceppo di *B. subtilis* in presenza di piritiagina. A tale scopo abbiamo saggiato una serie di vitamine del gruppo B e un idrolisato di caseina. I risultati sono riportati nella tabella 4.

Infine in un'altra esperienza è stata saggiata una combinazione della

miscela di vitamine-idrolisato di caseina con la tiamina; quest'ultima in due concentrazioni: mcg 0,1/cm³ e mcg 0,025/cm³. L'effetto della tiamina non viene modificato dalla contemporanea presenza delle sostanze provate (Fig. 1).

TABELLA 4

Azione di una serie di vitamine del gruppo B e di un idrolisato di caseina sul *B. subtilis* B25, in presenza di piritiamina.

	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)	—
Irolisato di caseina (vitamin free casaminoacids, Difco; 50 mg/cm ³)	—
Idrolisato di caseina + vitamine	—

2. - CURVA DI TARATURA. — La curva di taratura da noi costruita dimostra che nelle condizioni del nostro esperimento il diametro degli aloni di crescita varia linearmente con il logaritmo della dose, nell'ambito compreso tra 0,5 mcg/cm³ e 0,025 mcg/cm³ (Fig. 2).

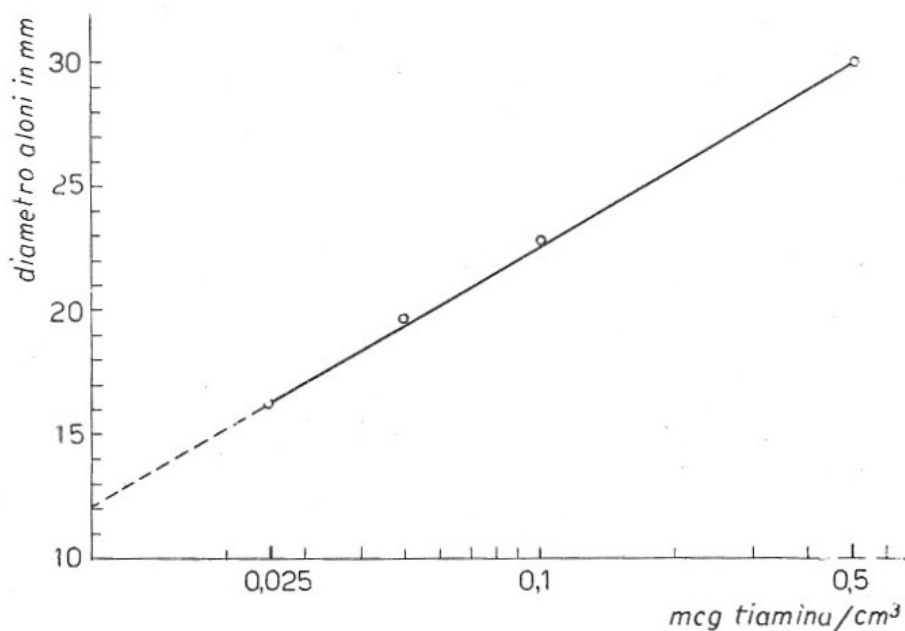


Fig. 2. - Dosaggio della tiamina: sull'asse delle ascisse, logaritmo delle concentrazioni di tiamina, sull'asse delle ordinate, diametri degli aloni di crescita in mm.

3. - SENSIBILITA' DEL METODO. — Come abbiamo già detto il metodo che descriviamo si basa sulla possibilità di riattivare, mediante la tiamina, la crescita di un ceppo inibito da un antagonista specifico della tiamina: la piritiamina.

Com'è facilmente intuibile, l'entità della risposta alla tiamina varia soprattutto in funzione della quantità di inibitore presente nel terreno.

Ciò è dimostrato dall'esperimento riportato nella tabella 5, eseguito in terreno di Davis liquido in cui a varie concentrazioni di piritiamina corrispondono concentrazioni scalari di tiamina: diminuendo la dose di piritiamina, diminuisce anche la dose di tiamina necessaria per la riattivazione della crescita (Tab. 5). Altrettanto avviene in terreno solido: ai fini del dosaggio è stato necessario saggiare varie diluizioni di piri-

TABELLA 5

Risposta alla tiamina in presenza di diverse concentrazioni di piritiamina in terreno liquido (ceppo B25).

Tiamina mcg/cm ³	Piritiamina mcg/cm ³		
	0,2	0,05	0,01
0,001	+	+	+
0,0005	—	+	+
0,00025	—	—	+
0,00005	—	—	—
0,00001	—	—	—

tiamina per trovare la concentrazione che permettesse di ottenere una riattivazione con dosi sufficientemente basse di tiamina, fornendo contemporaneamente aloni netti e ben misurabili.

Si è dimostrata idonea allo scopo la dose di 0,0028 mcg/cm³ di agar: essa permette di ottenere aloni leggibili deponendo sulla superficie dell'agar-germi-piritiamina cilindretti contenenti diluizioni di tiamina comprese tra 0,02 mcg/cm³ e 0,5 mcg/cm³.

La sensibilità del metodo può essere ulteriormente incrementata effettuando il dosaggio in terreno di Davis liquido: usando concentrazioni di piritiamina di 0,01 mcg per cm³ di terreno, è possibile aumentare di circa 100 volte la sensibilità (fino a 0,0002 mcg di tiamina).

4. - 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 il *Penicillium chrysogenum* 152, differendo solo le dimensioni della piastra e la distanza tra le capsuline. Le concentrazioni usate per lo standard sono 0,2 mcg/cm³ e 0,02 mcg/cm³.

Il calcolo del titolo dei campioni ignoti e il calcolo del relativo errore sono stati eseguiti mediante lo stesso procedimento già descritto nel succitato lavoro. L'errore è compreso nell'ambito di $\pm 10\%$.

Come campioni a titolo ignoto abbiamo scelto quattro specialità medicinali del commercio e quattro campioni di latte di varia provenienza. Le titolazioni sono state eseguite parallelamente con un altro metodo

TABELLA 6

Titolazioni di alcuni campioni di tiamina eseguite parallelamente con metodi microbiologici e chimico.

Specialità medicinali	Tiocromo	Penicillium chrysogenum	B. subtilis B 25 + piritiamina
1 (fiala da 25 mg)	22,5 mg	24 mg	21 mg
2 (fiala da 50 mg)	40 mg	42 mg	38,5 mg
3 (tavoletta da 25 mg)	25,5 mg	27 mg	24 mg
4 (supposta da 25 mg)	19,5 mg	21 mg	20 mg
Campioni di latte			
1	—	0,38 mg/l	0,40 mg/l
2	—	0,25 mg/l	0,21 mg/l
3	—	0,42 mg/l	0,48 mg/l
4	—	0,35 mg/l	0,32 mg/l

microbiologico e, limitatamente alle specialità medicinali, con il metodo chimico al tiocromo.

I risultati sono riportati nella tabella 6.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il metodo descritto presenta i seguenti vantaggi:

1) Specificità assoluta nei riguardi della risposta alla tiamina.

2) Il metodo consente di graduare la sensibilità alla tiamina a seconda delle esigenze della ricerca, aumentando o diminuendo la dose di antimetabolita aggiunta al terreno: la sensibilità alla tiamina è infatti inversamente proporzionale alla concentrazione di piritamina nel terreno.

3) Il comportamento del ceppo non è soggetto alle variazioni di sensibilità così frequenti nei ceppi mutanti.

4) Semplicità di allestimento delle prove: disponendo di una sospensione di spore (che peraltro può essere conservata in frigorifero per qualche mese) la titolazione può essere effettuata in qualsiasi momento e in tempo relativamente breve. Non è necessario che i campioni e lo standard siano sterili.

5) Economia di materiali: il terreno di coltura è di facile preparazione ed è lo stesso che si usa per la titolazione della vitamina B₁₂, mediante il mutante di *E. coli* 113/3.

6) Rapidità del metodo: le letture dei risultati si eseguono dopo 24 ore di incubazione a 37°C.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PRINCIVALLE M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 21: 701 (1958).
 - (²) MASTROPIETRO CANCELLIERI M. F. e MORPURGO G. - Annali XI Congresso Naz. Microbiologia, in corso di stampa.
 - (³) GAUDIANO A., MASTROPIETRO CANCELLIERI M. F. e PRINCIVALLE M. - Annali XI Congresso Naz. Microbiologia, in corso di stampa.
-