

## **B12 AGAR ESCHERICHIA COLI**

**Dosaggio della vitamina B12 in accordo al metodo FU  
con il ceppo *E. coli* ATCC 11105**

**FORMULA TIPICA (G/L)**

Potassio fosfato bibasico	7.0
Potassio fosfato monobasico	3.0
Sodio citrato	0.5
Magnesio solfato	0.1
Ammonio solfato	1.0
Glucosio	4.0
Agar	15.0

**PREPARAZIONE**

Sospendere 30.6 g di polvere in 1000 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121° C per 15 minuti. Raffreddare in bagnomaria termoregolato a 50°C, aggiungere una soluzione di 2, 3, 5, trifeniltetrazolio cloruro sterilizzata per filtrazione (soluzione al 2%: 1 ml per 100 ml di terreno) ed inoculare.  
pH finale 7.0 ± 0.1.

**IMPIEGO**

B12 Agar Escherichia coli è impiegato per il dosaggio microbiologico della vitamina B12 secondo il metodo raccomandato dalla FU VIII.

Reattivi:

a) Vitamina B12 standard di riferimento: usare cianocobalamina standard OMS o un substandard titolato su di esso.

Controllare spettrofotometricamente il titolo, allestendo una soluzione acquosa contenente 20 mg/ml.

b) Soluzione madre di vitamina B12 (20 µg/ml).

Preparare una soluzione sterile in tampone fosfati pH 5.0 che contenga 0.2 mg/ml di vitamina B12 (standard di riferimento). Distribuire tale soluzione in fiale sterili; chiudere le fiale alla fiamma e conservarle in frigorifero al riparo dalla luce.

Soluzione tampone fosfati pH 5.0

Monopotassio fosfato g 8.390

Disodio fosfato 0.180

Potassio cianuro 0.001

Acqua distillata fino a 1000 ml. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

c) Soluzioni standard di vitamina B12 (0.1-0.01 µg/ml).

Diluire 1 ml della soluzione madre a 200 ml con acqua distillata (0.1 µg/ml): diluire 10 ml di quest'ultima soluzione a 100 ml con acqua distillata (0.01 µg/ml).

Tali soluzioni devono essere preparate al momento dell'uso.

d) Soluzioni da saggiare.

Prelevare una quantità nota di campione, contenente circa 10 mg di vitamina B12, aggiungervi 10 ml di soluzione tampone pH 5.0, agitare e lasciare a temperatura ambiente per un'ora. Autoclavare a 121°C per 6 minuti e riportare a volume con acqua distillata.

Preparare due soluzioni che contengano una quantità teorica di vitamina B12 uguale a quella contenuta nelle due soluzioni standard, diluendo ulteriormente con acqua distillata.

e) Ceppo titolatore.

*Escherichia coli* ATCC 11105 (113/3).

f) Terreno per conservazione ceppo titolatore.

Coltivare il ceppo, per striscio, in B12 Escherichia Coli Nutrient Agar avendo cura di eseguire ogni settimana un trapianto in doppio: incubare i tubi a 37°C per 24 ore, toglierli dal termostato e conservarli in frigorifero.

g) Terreno per l'inoculum.

Distribuire in tubi 10 ml di B12 Escherichia Coli Nutrient Broth.

h) Preparazione dell'inoculum.

Il giorno prima della prova trapiantare il ceppo titolatore in terreno per inoculum e coltivare a 37°C per 16-24 ore. Immediatamente prima dell'uso versare la brodocoltura in una provetta da centrifuga sterile (tappo a vite), centrifugare a 3000 giri per 10 minuti, decantare il sovrantante, risospendere le cellule in 10 ml di soluzione fisiologica sterile, centrifugare di nuovo a 3000 giri per 10 minuti; ripetere tale procedimento per un totale di quattro volte.

Dopo l'ultimo lavaggio sospendere le cellule in 10 ml di soluzione fisiologica sterile.

### **PROCEDIMENTO**

Aggiungere 2.5 ml di inoculum ad ogni 100 ml di terreno basale di prova, mescolare accuratamente e versare in piastre sterili in quantità tale da ottenere uno strato di circa 3 mm di spessore.

Le piastre devono avere il fondo piano ed essere disposte su una superficie ben orizzontale.

Lasciar solidificare il terreno ed assicurarsi che la superficie dell'agar sia perfettamente asciutta.

Deporre sulla superficie dell'agar, in volumi uniformi, le due soluzioni standard e le due soluzioni da saggiare, facendo uso di cilindretti di porcellana o acciaio o di dischetti di carta da filtro sterili.

È possibile anche scavare dei pozzetti a tutto spessore nel terreno e deporvi le soluzioni.

Le soluzioni vanno disposte secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati (4 o 9) per un dosaggio biologico a 4 punti (2 concentrazioni dello standard e 2 del campione).

A tal fine è possibile utilizzare piastre Petri del solito tipo (diametro 9-10 cm): ogni piastra può accogliere 4 cilindretti e può essere considerata come un blocco.

Se possibile, è meglio utilizzare piastre quadrate di dimensioni tali che sia possibile disporvi 16 o 36 cilindretti (4 o 9 blocchi randomizzati di 4 punti).

Incubare le piastre così allestite a 37°C per 18-24 ore.

Misurare con precisione il diametro degli aloni di crescita.

Procedere al calcolo del titolo secondo le modalità descritte dalla FU VIII.

### **BIBLIOGRAFIA**

- Davis B.D. & Mingioli, E.S. (1950) - Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12, J. Bact., 60, 17- 28.
- FU VIII (1972).
- Salvini Bolzoni, C. (1952) - Dosaggio della vitamina B12 con un mutante di *Escherichia coli* 113/3. Boll. Ist. Sieroter. Mil. 31, 97-108.
- Tampieri A. & Madno G. (1963) - Rilievi sul dosaggio microbiologico della vitamina B12 con il *Lactobacillus leichmannii* 7830 e con l'*Escherichia coli* 113/3 Boll. Ist. Sieroter. Mil., 42, 296-315.

### **CONFEZIONI**

<b>4011761</b>	<b>B12 Agar Escherichia Coli</b>	<b>100 g (3.2 l)</b>
<b>4011762</b>	<b>B12 Agar Escherichia Coli</b>	<b>500 g (16.3 l)</b>