

# TECHNIKA LABORATORYJNA

KONRAD MALICKI

## Technika namnażania wirusów ospy ptaków (*Poxvirus avium*) w hodowlach jednorazowych komórek zarodka kury oraz zarodków innych gatunków ptaków domowych\*) I. Zakładanie hodowli komórek i zakażanie wirusem\*\*)

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW w Warszawie  
Kierownik: prof. dr J. BRILL

Rozwój metod namnażania wirusów ospy ptaków, podobnie jak i innych wirusów zwierzęcych, jest ściśle uwarunkowany ogólnym postępem techniki wirusologicznej, a w szczególności techniki hodowli tkanek, czy komórek *in vitro*. O ile początki metody namnażania wirusów w zarodkach kury (22), czy eksplantatach tkankowych (2, 3, 7, 12), związane były bezpośrednio z wirusami ospy ptaków, o tyle osiągnięcia *Dulbecco* (5, 6), czy *Youngera* (23), zostały wprowadzone do namnażania wirusów ospy ptaków stosunkowo późno. Jako jedni z pierwszych podjęli badania w tym zakresie *Köhler* i *Schwöbel* (11). Udoskonalenie metody namnażania wirusów ospy ptaków w hodowli komórek zarodka kury jest rezultatem prac *Mayra* i *Kalcher* (17, 18) oraz innych badaczy (1, 4, 8). Ostatnio wykazano przydatność hodowli komórek z zarodków indyka, gołębia, kaczki i gęsi do namnażania i badania różnych typów wirusa ospy ptaków (13). Obecnie hodowle komórek z zarodków kury a także z zarodków innych gatunków ptaków, znajdują zastosowanie w badaniach eksperymentalnych jako wygodna i dobra metoda namnażania, miareczkowania a nawet różnicowania wirusów ospy ptaków (13, 15, 17, 18), dalej jako metoda atenuowania wirusa terenowego (19) oraz jako metoda namnażania wirusa przy próbach produkcji nowoczesnych szczepionek zapobiegawczych (1, 4, 16). Hodowle komórek z zarodka kury nadają się również do namnażania i innych wirusów ospowych jak wirus krowianki, ekstremelii i myksomatozy.

Przedstawiona metoda może być łatwo przyswojona przez usługowe pracownie wirusologiczne przy WZHW i prowadzona w oparciu o płyny do hodowli tkanek, produkowane przez Lubelską Wytwórnę Surowic i Szczepionek, względnie przygotowywane we własnym zakresie z odczynników krajowych.

1. *Płyny*. Do opisywanej metody potrzebne są następujące płyny (składu płynów nie podano, gdyż są one opisane w dostępnych podręcznikach wirusologii (11, 20): płyn *Earla* (roztwór podstawowy soli); płyn *Earla* o podwójnej koncentracji składników (z wyjąt-

kiem  $\text{NaHCO}_3$ , który powinien być w ilości pojedynczej); PBS (phosphate buffered saline wg *Dulbecco*); PBS-T (0,25% roztwór trypsyny w PBS); 5% roztwór hydrolizatu laktalbuminy (hydrolizat laktalbuminy rozpuścić na gorąco w łaźni 60–62° w płynie *Hanksa* bez  $\text{Na HCO}_3$ , przefiltrować na gorąco i przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze 37°); surowica cielęca filtrowana (filtr *Seitza*, wkładka EK); bydlęcy płyn amnionalny, filtrowany jak surowica; 50% ekstrakt embrionalny z zarodków kury, przygotowany na płynie *Earla* (ekstrakt przechowywać w –20°, w probówkach wirówkowych szczelnie zamkniętych korkami gumowymi); 3% agar Difco w wodzie redestylowanej; 0,1% roztwór czerwieni fenolowej wg *Parkera*; 0,1% roztwór fioletu krystalicznego w 0,1 M wodnym roztworze kwasu cytrynowego, 1% roztwór czerwieni obojętnej; woda redestylowana jałowa do sporządzania roztworu antybiotyków; antybiotyki (penicylina krystaliczna, streptomycyna).

2. *Źródło komórek*. Źródłem wyjściowym do założenia hodowli komórek są 10–11-dniowe zarodki kury. Do specjalnych celów, mogą być również użyte zarodki indyka, gołębia, kaczki, względnie gęsi w odpowiednim wieku. Hodowle komórek zarodka kury nadają się do namnażania wszystkich 4 typów wirusa ospy ptaków (wirus ospy kur, indyków, gołębi i karnarków). W hodowlach komórek z zarodków pozostałych, wyżej wymienionych gatunków ptaków, wirusy ospy kur, indyków i gołębi namnażają się, ale zależnie od typu wirusa i gatunku zarodków użytych do przygotowania hodowli komórek, można otrzymać dość znaczne różnice w wysokości miana, przy namnażaniu i miareczkowaniu wirusa (13). Tabela 1 przedstawia w oparciu o badania własne, przydatność zarodków różnych gatunków ptaków, w różnym wieku, do założenia hodowli komórek oraz niektóre właściwości otrzymywanych hodowli komórek. Właściwości wirusów pasażowanych w hodowlach komórek z zarodków innych gatunków ptaków niż kura, nie zostały dotąd bliżej zbadane.

3. *Zakładanie hodowli komórek*. Przed przystąpieniem do pracy trzeba obliczyć ilość zarodków potrzebną do założenia żądanej ilości jednorazowych hodowli. Przy obliczeniu można orientacyjnie przyjąć, że z jednego zarodka, przy jednokrotnej trypsynizacji, uzyska się materiał na 12–15 dużych probówek (16×160 mm), po 2 ml zawiesiny na probówkę (proporcja 1:24 do 1:30), względnie na 3 płytki *Petriego* ( $\Phi$  ca 40 mm), po 4 ml zawiesiny na płytkę (proporcja 1:12). Celem zwiększenia ilości komórek uzyskiwanych z tkanek zarodków, można stosować dwu lub trzykrotną trypsynizację pobranych tkanek.

Po wyjęciu zarodków z jaj wylęgowych w ogólnie przyjęty sposób, należy je przepłukać trzykrotnie w PBS na płytkach *Petriego*, usuwając kolejno głowę, nóżki i trzewia. Z kolei tuszki przenieść do jałowej (chłodnej) 50 ml strzykawki i tłoczkiem przecisnąć je do kolbki o pojemności 200–500 ml, zawierającej jałową sztabkę magnetyczną. Do kolbki dodać PBS-T o temperaturze 37°, w proporcji 10–15 ml na jeden zarodek, kręcić przez chwilę na mieszadle elektromagnetycznym, po czym płyn zdekantować i po ponownym

\*) Materiały do pracy zebrano częściowo w okresie pobytu w Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere w Monachium, w ramach stypendium Fundacji „Alexander von Humboldt-Stiftung”.

\*\*) Drugi odcinek pracy ukaże się w kolejnym numerze Med. Wet. 1967.

Tab. 1. Wyniki inkubacji i trypsynizacji zarodków różnych gatunków ptaków oraz niektóre właściwości hodowli komórek z nich uzyskiwanych, według badań własnych (1, 14)

Gatunek ptaka	Wiek zarodków (dni)	Przebieg inkubacji w 37,8°C	Sprawność trypsynizacji w 37°C	Właściwości hodowli komórek		Przydatność hodowli do namnażania wirusów ospy <sup>2)</sup>				
				czas wzrostu hodowli w 37°C (godz.)	trwałość hodowli (dni)		kur.	ind.	goł.	kan.
					w probówkach	w płytkach				
Kura	10	+++	+++	18-24	10-14	12	+++	++	++	+++
	11	+++	+++							
	13	+++	+++							
Indyk	10	+++	++	18-24	9-12	12	++	+++	+	++
	11	+++	++							
	13	+++	++							
Gołąb	10	+	++	18-48	8-10	6-10	+	+++	+++	+++
	11	+ <sup>1)</sup>	++							
	16	+	++							
Kaczka	10	++	+++	18-24	8-12	12	+	(+) +	+	++
	11	++	+++							
	13	++	+++							
Gęś	11	++	+++	18-24	10-12	n.b.	+++	++	++	+++
	17	++	+++							

Legenda: 1) wysoka śmiertelność zarodków w przebiegu inkubacji.

2) badane szczepy były uprzednio zaadaptowane do hodowli komórek zarodka kury.  
n.b. — nie badano.

uzupełnieniu ilości PBS-T, trypsynizować jeden raz (20 min.), względnie dwa razy (20 min. i 15 min.), zależnie od ilości użytych zarodków. Obroty mieszadła powinny być wolne, przy zbyt szybkich obrotach duża ilość komórek obumiera. Uzyskaną zawiesinę komórek przesączyć przez 6 warstw jałowej gazy do zlewki i przesączyć odwirować (w jednej lub dwóch dużych pro-

dowli komórek na płytkach *Petrie*go potrzebna jest zawiesina komórek w podłożu namnażającym o koncentracji 800 000—1 000 000 komórek w ml, a do założenia hodowli w probówkach, butelkach itp., zawiesina o koncentracji 400 000—500 000 komórek w ml podłoża namnażającego. Pożądaną koncentrację komórek w podłożu namnażającym można otrzymać w dwójaki sposób: a) rozcieńczając zawiesinę macierzystą w podłożu namnażającym, biorąc pod uwagę procent komórek — 0,4—0,6% komórek w podłożu namnażającym (zawiesina do hodowli płytkowych), względnie 0,2—0,3% komórek w podłożu namnażającym (zawiesina do hodowli probówkowych), lub b) licząc najpierw ilość żywych komórek w zawiesinie macierzystej, a następnie, rozcieńczając ją odpowiednio podłożem utrzymującym. Do liczenia komórek trzeba tu użyć komorę *Fuchs-Rosenthala*, a zawiesinę macierzystą



Ryc. 1. Hodowla komórek zarodka indyka

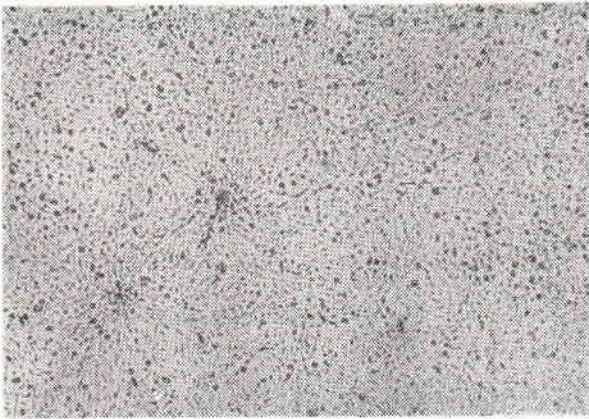
bówkach) przez 5 minut z szybkością 800—1000 obrotów na minutę. W czasie biegu trypsynizacji przygotować potrzebną ilość podłoża namnażającego o składzie: płyn *Earla* zawierający antybiotyki po 100 j. na ml i czerwień fenolową 0,001—0,002% — 80%, 5% roztwór hydrolizatu laktalbuminy — 10%, surowica cielęca — 10%. (W razie potrzeby skorygować pH podłoża, wdmuchując dwutlenek węgla jałowo do naczynia z płynem, do zabarwienia pomarańczowo-różowego). Do namnażania komórek zarodków ptaków mogą być użyte i inne podłoża płynne np. przygotowane na płynie *Hanksa*, podłoże *Eagla* z dodatkiem 10% surowicy cielęcej itp. Po zakończeniu wirowania osad komórek spłukać niewielką, określoną ilością płynu *Earla* (5—20 ml), tworząc w ten sposób zawiesinę macierzystą komórek. (Odejmując ilość użytego płynu *Earla* od ilości uzyskanej zawiesiny macierzystej, można ustalić ilość uzyskanego osadu komórek). Do założenia ho-



Ryc. 2. Hodowla komórek zarodka gołębia

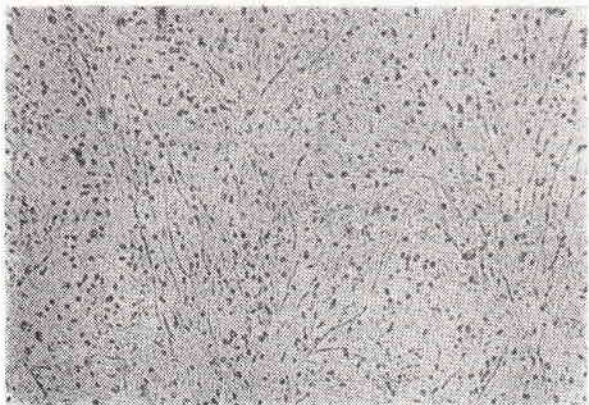
rozcieńczyć wstępnie 1:10 w następujący sposób: 1,0 ml roztworu fioletu krystalicznego 0,1%, 0,8 ml płynu *Earla*, 0,2 ml zawiesiny macierzystej. Po dokładnym wymieszaniu i naniesieniu na komorę, liczyć żywe komórki na powierzchni 1 mm<sup>2</sup> (16 małych kwadratów wzdłuż przekątnej komory). Otrzymany wynik pomnożyć przez 5 (głębokość komory wynosi 0,2 mm),

dalej pomnożyć przez 10 (rozcieńczenie wstępne zawiesiny macierzystej do liczenia) i pomnożyć przez 1 000, uzyskując w ten sposób liczbę komórek w jednym ml zawiesiny macierzystej. Wygodnie jest sporządzić najpierw gęstszą zawiesinę potrzebną do rozlewania na płytki, wykonać odpowiednią ilość płytek, następnie zawiesinę rozcieńczyć 1:2 dodatkową ilością podłoża namnażającego i rozlewać do probówek po 2 ml, do butelek *Legroux*, butelek *Philipsa* po 12—18 ml, względnie do butelek *Roux* po 80—100 ml. Naczynia szczelnie zamknąć jałowymi korkami gumowymi (z gumy nietoksycznej).



Ryc. 3. Hodowla komórek zarodka kury

4. Inkubacja nowo założonych hodowli komórek. Kontrola mikroskopowa hodowli oraz wymiana podłoża namnażającego na podłoże utrzymujące w hodowlach komórek z zarodków różnych gatunków ptaków, może być przeprowadzona w zwykły, ogólnie przyjęty sposób. Temperatura inkubacji hodowli 37°, czas inkubacji 20—24 godzin, wyjątkowo 48 godzin (głównie hodowle komórek zarodka gołębia). Hodowle na płytkach *Petriego* trzeba inkubować w cieplarni z dopływem CO<sub>2</sub> (ca 5% CO<sub>2</sub> w atmosferze). Dobrym podłożem utrzymujących dla hodowli komórek zarodka kury, względnie zarodków innych gatunków ptaków jest bydlęcy płyn amnionalny z dodatkiem zwykłej ilości antybiotyków i czerwieni fenolowej. Mogą też być użyte inne podłoża utrzymujące, przygotowane z płynu *Earla*, płynu *Hanksa* itp. Hodowle komórek zbyt długo namnażane, a więc zbyt gęste, ulegają szybko odlepieniu od szkła, prócz tego namnażanie wirusów ospy ptaków przebiega w nich mniej sprawnie.



Ryc. 4. Hodowla komórek zarodka kaczkii

5. Zakażenie hodowli wirusem. Materiałem wyjściowym do zakażenia hodowli komórek jest 10% zawiesina (waga/objętość) zakażonej wirusem błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, w płynie utrzymującym, płynie *Earla*, lub buforowym roztworze

NaCl. Użycie do zakażenia wyjściowego zawiesiny przygotowanej bezpośrednio ze zmian ospowych skórnych, czy śluzówkowych od chorych ptaków, nie jest korzystne ze względu na występowanie obfitej flory bakteryjnej postronnej. Przy pasażowaniu wirusa w hodowli komórek, materiałem do zakażenia nowej hodowli jest płyn utrzymujący z poprzedniego doświadczenia. W przypadku miareczkowania, należy sporządzić serię rozcieńczeń materiału wirusowego w podłożu utrzymującym, lub w płynie *Earla*, stosując dziesięciokrotne (przeważnie) rozcieńczenie wirusa w zasady 0,3 + 2,7 ml.

Zakażenie wirusem hodowli komórek można przeprowadzić w dwojaki sposób: a) dodając materiał wirusowy wprost do podłoża utrzymującego, lub b) stosując adsorpcję wirusa do komórek hodowli. W tym drugim przypadku, podłoże namnażające należy usunąć z hodowli, hodowlę przepłukać podłożem utrzymującym, względnie samym płynem *Earla*. Płyn przepłukujący usunąć z hodowli, po czym dodać materiał wirusowy i adsorbować go na komórkach w temperaturze 37° przez okres 1—2 godziny. Po adsorpcji, płyn z wirusem można usunąć, lub pozostawić (hodowla może być także przepłukana, jeżeli wymaga tego doświadczenie), po czym dodać do hodowli podłoże utrzymujące. Dawka zakażająca wynosi przy miareczkowaniu i pasażowaniu szczepów zaadaptowanych, dla probówek 0,1 ml, dla butelek *Legroux*, butelek *Philipsa* 0,5—1,0 ml, dla butelek *Roux* 5,0—10,0 ml, a dla płytek *Petriego* o średnicy ca 44 mm 0,2 ml. Dla szczepów niezaadaptowanych, lub trudnych w hodowli, w pierwszych kilku pasażach lepiej stosować duże dawki 0,5—1,0 ml na probówkę.

Dodatkowego omówienia wymaga zakażenie wiru-



Ryc. 5. Hodowla komórek zarodka gęsi

sem hodowli komórek na płytkach *Petriego*. Hodowle takie zakażane są z reguły przez zastosowanie jednogodzinnej adsorpcji wirusa, przeprowadzanej w temperaturze 37°, w cieplarni z dopływem CO<sub>2</sub>. Zakażone wirusem hodowle można dalej inkubować w cieplarni z ciągłym dopływem CO<sub>2</sub> w dwojaki sposób: pod warstwą płynnego podłoża utrzymującego, lub pod warstwą odżywczego żelu agarowego, tzw. „overlay” do „plaque test” według metody *Dulbecco* (5).

6. Pokrywanie hodowli komórek warstwą żelu agarowego. Wykonanie tego zabiegu po przeprowadzonej adsorpcji wirusa, stwarza specjalne wymogi dotyczące czasu wykonania, a zwłaszcza temperatury używanych płynów. Płyn do wykonania „overlay” składa się w równych częściach z trzech składników: podwójnego płynu *Earla*, ekstraktu embrionalnego i 3% agaru w wodzie redestylowanej. Do pokrycia płytki o średnicy ca 40 mm potrzebne jest 3,0—3,5 ml płynu, dla płytki o średnicy ca 60 mm 5,5—6,0 ml, a dla płytki o średnicy ca 100 mm ca 8—10 ml.

Po wstawieniu płytek do cieplarki w celu adsorpcji wirusa do komórek, rozpuścić w łaźni wodnej 3% agar i po rozpuszczeniu butelkę z agarom przenieść do łaźni wodnej o temperaturze 43—45°. Na 15 minut

przed upływem czasu adsorpcji wirusa, dodać do podwójnego płynu Earla podwójną ilość antybiotyków (po 200 j. na ml) oraz zwykłą ilość czerwieni fenolowej. Odpowiednią ilość tego płynu przemieścić do jałowego cylindra, następnie dodać taką samą ilość odwirowanego ekstraktu embrionalnego i cylinder dostawić do łaźni wodnej o temperaturze 43—45°. Gdy upływie czasu adsorpcji wirusa, dodać do cylindra należną ilość rozpuszczonego agaru, dokładnie wymieszać i z cylindra pozostającego stale w łaźni wodnej rozlewać zawartość ciepłą, lecz niegorącą pipetą na płytki. Płyn nalewać po ściance, po czym zakreślić płytką, celem wymieszania płynów oraz celem pokrycia warstwą agaru także i części ścianki płytki. Chroni to przed podplywaniem na dno płytki płynów odżywczych, dodawanych później na powierzchnię warstwy agarowej. Po zakrzepnięciu agaru, płytki ustawić dnem do góry w cieplarni z dopływem CO<sub>2</sub>. Wytworzenie się „plaques” w przypadku wirusów ospy ptaków wymaga przy tej metodzie 6—10 dni inkubacji. Zachodzi więc konieczność „dożywiania” komórek w tym okresie czasu (18). W tym celu w trzecim i szóstym dniu inkubacji dać na powierzchnię agaru płyn odżywczy o składzie: jedna część ekstraktu embrionalnego i dwie części zwykłego płynu Earla. Na płytce o średnicy ca 40 mm dać 1,0—1,5 ml płynu, na płytce większe odpowiednio więcej.

6 części	80% pł. Eagla <sup>4)</sup> (podwójny)	koncentrat witamin <sup>1)</sup>	20 ml
		roztwór aminokwasów L <sup>2)</sup>	20 ml
5 części	2% agar Difco w wodzie redestylowanej	glutamina 5% roztwór wodny <sup>3)</sup>	6 ml
		antybiotyki	po 200 000 j.
		pł. Earla podwójny (NaHCO <sub>3</sub> pojedynczo)	ad 1 000 ml
		20% surowica cieleca	

<sup>1)</sup> TC Vitamins Eagle 100 X, DIFCO. <sup>2)</sup> TC Amino Acids L 100 X, DIFCO. <sup>3)</sup> TC Glutamine Sterile 5% desiccated, DIFCO. <sup>4)</sup> W razie potrzeby pH powyższego płynu można korygować przez dodanie 8—10% NaHCO<sub>3</sub>.

W metodzie wzorowanej na metodzie Dulbecco (5), „overlay” składa się z podwójnego płynu Eagla (przygotowanego na podwójnym płynie Earla) i z surowicy cielecej, zmieszanych w proporcji 6:5 z 2% agarem. Dokładny skład ilustruje następujące zestawienie:

Technika wykonania jest analogiczna jak poprzednio opisano. Przy tej metodzie ogniska wywoływane przez wirusy ospy ptaków pojawiają się wcześniej, bo na 5—6 dzień po zakażeniu hodowli i nie zachodzi potrzeba dodawania płynów odżywczych na powierzchnię agaru. Metoda druga jest wygodniejsza, wymaga jednak stosowania importowanych preparatów, w metodzie pierwszej preparaty te zastępuje ekstrakt embrionalny.

#### Piśmiennictwo

- Bamberger K., Markovits P.: Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 15, 161, 1965.
- Bang F. B., Levy E., Gey G. O.: J. Immunol. 66, 329, 1951.
- Bierbaum G., Gaede H.: Arch. wiss. u. prakt. Tierheilk. 69, 441, 1935.
- Doyle T., Dobson N., Martin R.: Vet. Rec. 75, 359, 1963.
- Dulbecco R.: J. exp. Med. 99, 167, 1954.
- Dulbecco R., Vogt M.: Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 376, 1952.
- Findlay G. M.: Brit. J. Exp. Path. 9, 28, 1928, cyt. za 17.
- Kangude G. M., Hanson L. E.: J. vet. anim. Husb. Res. (Mhow). 6, 1, 1962.
- Kärber G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480, 1931.
- Köhler H., Schwöbel W.: Zbl. Bakt. I Orig. 166, 454, 1956.
- Larski Z.: Wirusologia Weterynaryjna, PWRiL Warszawa 1965.
- Loewenthal H.: Klin. Wschr. 7, 349, 1928, cyt. za 17.
- Malicki K.: Med. Dośw. i Mikrobiol. 1967/1968 — w druku.
- Malicki K.: Medycyna Wet. 1967 — w druku.
- Mayr A.: Berl. Münchener Tierärztl. Wschr. 16, 316, 1963.
- Mayr A., Hartig F., Bayr I.: Zbl. f. Vet. Med., Reihe B, 12, 41, 1965.
- Mayr A., Kalcher K.: Arch. ges. Virusforsch. 10, 72, 1960.
- Mayr A., Kalcher K.: Arch. ges. Virusforsch. 11, 307, 1961.
- Mayr A., Malicki K.: Zbl. f. Vet. Med., Reihe B, 13, 1, 1966.
- Przesmycki F.: Zarys Wirusologii Praktycznej, PZWL, Warszawa 1963.
- Reed L. J., Muench H.: Amer. J. Hyg. 27, 493, 1938.
- Woodruff A. M., Goodpasture E. W.: Amer. J. Path. 7, 209, 1931.
- Younger J. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 202, 1954.

Adres autora: dr Konrad Malicki, Warszawa, ul. Juliana Bruna 14 m. 20.

KRYSTYNA ZIMOWSKA

## Ocena metod oznaczania poziomu magnezu w surowicy

Katedra Farmakologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie  
Kierownik: prof. dr G. STAŚKIEWICZ

Do oznaczania poziomu magnezu w surowicy stosuje się szereg metod i jak dotychczas żadna z nich nie została uznana za metodę standardową.

W ostatnich latach za najbardziej przydatną do badań klinicznych uważa się metodę Lange'go (9) lub Andreansena (1). W pracy tej zajęliśmy się oznaczaniem poziomu magnezu w surowicy sześcioma metodami w celu wybrania jednej z nich nadającej się najlepiej do rutynowych oznaczeń.

#### Materiał i metody.

Badano surowice od 10 krów rzeźnych, w okresie od 28.IX.—6.X.1966 r. następującymi metodami:

I. Metoda pośrednia przez oznaczenie fosforu (2, 6) polega na wytrącaniu magnezu w postaci osadu fos-

foranu amonowo-magnezowego, kolorometrycznym określeniu związanego fosforu metodą Fiskego-Subbarowa i obliczeniu równoważnej zawartości magnezu.

II. Metoda Carubelliego (4,10) i III. metoda Holska i Flaschka (5). Polegają na kompleksometrycznym miareczkowaniu magnezu, kompleksem III wobec czerni eriochromowej T w środowisku amoniakalnym, po uprzednim usunięciu wapnia.

IV. Metoda Büchnera i Schöne (3) polega na spalaniu surowicy z H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w celu usunięcia nadmiaru szczawianu amonu, który tworzy z magnezem kompleks i utrudnia obserwację miareczkowania (3). Po spaleniu płyn neutralizuje się i oznacza magnez przez miareczkowanie kompleksem III.

V. Metoda Lange'go (9).

VI. Metoda Andreansena (1). W obu metodach żółcień tytanowa w środowisku alkalicznym pH 11—12 tworzy z koloidalnie rozproszonym wodorotlenkiem magnezowym czerwony związek kompleksowy, któ-