

# Isolamento in **coltura pura** di **batteri PSB** (Phosphate Solubilizing Bacteria)

**Obiettivo** Isolare e amplificare in coltura pura i batteri PSB, precedentemente selezionati da suoli agricoli di ulivo e di vite, concimati con fertilizzanti a base di fosfato, per compiere successive analisi di identificazione e caratterizzazione funzionale dei microrganismi isolati.

**Autore** Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto  
Secondo classificato Mad for Science 2019  
Progetto “Phosphorus for Future”



# Materiali e reagenti

- Colture di batteri PSB in terreno solido PVK
  - Terreno liquido Nutrient Broth
  - Tubi da 15 ml
  - Tappi per tubi
  - Pipette graduate
  - Anse da inoculazione sterili e monouso
  - Piastre Petri di terreno solido PVK (facoltativo)
  - Puntali sterili (facoltativo)
  - Pennarello
- 



## Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Pipettatore manuale o automatico
- Micropipetta (facoltativa)
- Termostato



## Sicurezza

- Camice
  - Guanti
- 



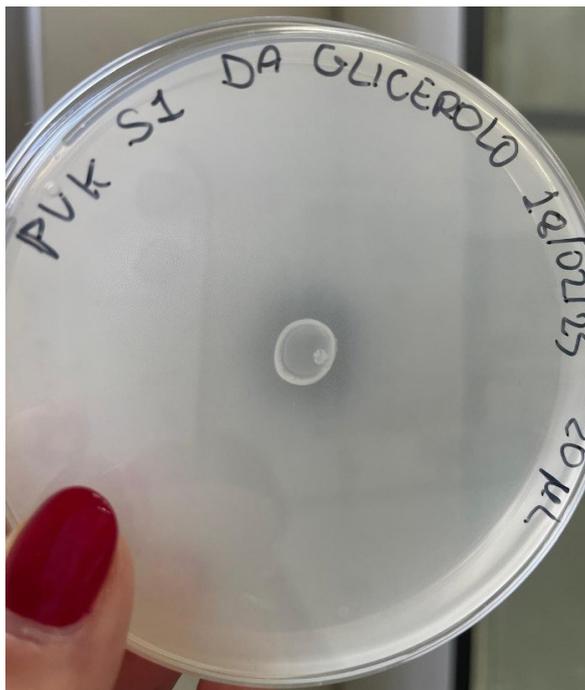
## Tempo

Circa 30 minuti per la semina dei batteri in terreno liquido e 3-4 giorni per la loro crescita



# Procedimento

- 1.** I batteri PSB, cresciuti in terreno solido PVK e ottenuti seguendo il protocollo “Isolamento di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) da suoli agricoli”, rappresentano il punto di partenza di questo protocollo.
- 2.** Selezionare i batteri che, crescendo, hanno prodotto un alone chiaro intorno alla colonia (come mostrato nell'immagine) e con un pennarello sul retro della piastra cerchiare e numerare in ordine crescente le colonie da isolare in coltura pura.
- 3.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e preparare tanti tubi quanti sono i batteri PSB da isolare, indicando il numero della colonia selezionata, il campione di suolo di partenza e la data di semina.
- 4.** Preparare anche un tubo in eccesso da usare come controllo negativo della crescita batterica. Nominare il tubo come “Controllo” e indicare la data.
- 5.** Con una pipetta, trasferire 10 ml di terreno liquido Nutrient Broth, preparato seguendo il protocollo “Preparazione del terreno Nutrient Broth liquido” in ogni tubo precedentemente allestito. Si raccomanda di agitare bene il terreno prima del prelievo.
- 6.** Con un'ansa da inoculazione sterile, toccare la colonia di batteri identificata con il numero 1 e stemperarla nel terreno liquido Nutrient Broth, contenuto nel tubo 1. Compiere nel terreno dei movimenti circolari dell'ansa per favorire il rilascio in soluzione del materiale biologico.
- 7.** Procedere secondo quanto descritto nel punto 6 per tutte le colonie batteriche selezionate, cambiando ogni volta l'ansa da inoculazione monouso.



**8.** Al termine della semina liberare la cappa biologica dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l'ambiente interno con la luce a raggi UV.

**9.** Incubare i tubi per 3-4 giorni in termostato statico con temperatura impostata a 37°C. La crescita dei batteri è evidenziata dalla torbidità del terreno di coltura (a destra dell'immagine). Il campione di controllo deve, invece, restare limpido (a sinistra dell'immagine).

**10.** Per accertarsi che nelle provette di terreno liquido non siano cresciuti anche altri batteri, oltre ai batteri PSB, è possibile eventualmente eseguire una semina per striscio su terreno solido PVK, secondo il procedimento descritto nelle note.

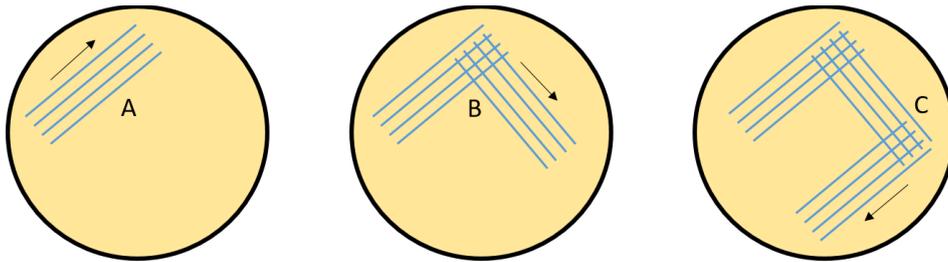
**11.** Procedere con la caratterizzazione e l'identificazione dei batteri PSB isolati, eseguendo la colorazione di Gram, secondo il protocollo "Colorazione di Gram" nella sezione "Microscopia e istologia", e i test biochimici per la ricerca di attività catalitica e ossidativa, come descritto nei protocolli "Il test della catalasi" e "Il test dell'ossidasi", entrambi presenti nella sezione "Biochimica".

**12.** Compiere anche in parallelo alcuni studi dell'attività dei batteri PSB, seguendo i protocolli della risorsa "Studio dell'attività dei batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)".



## Note

- A discrezione del docente che conduce l'esperienza, è possibile assicurarsi che nel terreno liquido Nutrient Broth siano cresciuti solo batteri PSB, seguendo il procedimento descritto di seguito:
  - sotto cappa biologica a flusso laminare, predisporre tante piastre di terreno solido PVK, preparate seguendo il protocollo "Preparazione del terreno PVK solido" della risorsa "Preparazione dei terreni per l'identificazione di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)", quanti sono i tubi di terreno liquido Nutrient Broth in cui sono stati isolati i batteri PSB. Numerare le piastre in ordine crescente. Preparare anche una piastra da usare come controllo negativo della crescita batterica e denominarla "Controllo";
  - con una micropipetta prelevare 10 µl di coltura liquida cresciuta nel tubo 1 e trasferirli nella piastra corrispondente in posizione laterale, senza toccare la superficie del terreno con il puntale;
  - con un'ansa da inoculazione sterile, spargere la coltura liquida, dapprima, nella porzione A della piastra e, successivamente, in tutta la sua superficie, compiendo il movimento descritto nella parte B e C dell'immagine sottostante al fine di ottenere, una volta cresciute, delle colonie singole;



- procedere in questa maniera per tutte le colture cresciute in terreno liquido Nutrient Broth, avendo cura di cambiare ogni volta il puntale di prelievo e l'ansa da inoculazione;
- incubare le piastre per 3-4 giorni in termostato a 37°C;
- osservare che non siano cresciute colonie senza la formazione dell'alone trasparente. Se così fosse, isolare nuovamente i batteri PSB dal campione di suolo raccolto.
- Il terreno PVK e il terreno Sperber possono essere entrambi utilizzati per riconoscere i batteri PSB, che formano aloni trasparenti intorno alle colonie interessate. Il team di docenti di scienze del Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto ha osservato che l'alone è più evidente nelle piastre con terreno PVK. Viene, quindi, privilegiato l'utilizzo del terreno PVK, ma nulla vieta di utilizzare il terreno solido Sperber.
- La semina per striscio su piastra permette di ottenere colonie di batteri singole, in quanto i movimenti descritti precedentemente hanno l'obiettivo di diluire la quantità di microrganismi trasportati dall'ansa.
- Per l'identificazione della/e specie dei batteri PSB isolati è stato utilizzato il Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (<https://static1.squarespace.com/static/54c7f25fe4b04447c7f8aed4b/t/5504c972e4b06ae7c7462e69/1426377074561/IDFlowcharts.pdf>), un manuale di riferimento per la classificazione di batteri sconosciuti sulla base di caratteristiche morfologiche e biochimiche. David Hendricks Bergey, professore di Batteriologia all'Università della Pennsylvania (USA), decise di unire le proprie conoscenze sui batteri, acquisite in anni di studi, con quelle di altri batteriologi sulla classificazione, dando origine alla prima edizione del manuale pubblicata nel 1923.
- Il manuale è costruito come un diagramma di flusso, che guida l'utente nei test biochimici da eseguire per classificare i batteri in una specifica famiglia e, successivamente, identificarne la specie. Il team di docenti di scienze del Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto ha, innanzitutto, osservato che i batteri PSB da loro isolati sono Gram negativi. Seguendo il Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, i docenti hanno successivamente effettuato il test biochimico dell'ossidasi, che ha mostrato esito negativo (i batteri PSB isolati non possiedono attività ossidativa e appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae). Ulteriori test riguardano la capacità dei batteri PSB di fermentare il lattosio e il test dell'indolo.
- Per impedire la contaminazione microbica, le operazioni vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare oppure sul bancone da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, in presenza della fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!).
- Non è sicuro accendere la fiamma del becco Bunsen sotto la cappa biologica, per cui la semina dei batteri sotto cappa deve essere effettuata esclusivamente con anse sterili e monouso. Se, invece, si effettua la semina sul banco da laboratorio in presenza di un becco Bunsen, è possibile utilizzare anse in acciaio inox.
- Per conoscere le buone pratiche da adottare al fine di mantenere la sterilità nel lavorare sotto cappa biologica, fare riferimento alle note dedicate nel protocollo "Isolamento di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) da suoli agricoli".