

Determinare l'**indice** e  
l'**efficienza** di **solubilizzazione**  
**del fosfato** da parte dei **batteri PSB**  
(Phosphate Solubilizing Bacteria)

**Obiettivo** Valutare la capacità dei batteri PSB di solubilizzare *in vitro* il fosfato, misurando il diametro dell'alone che si crea intorno alle colonie piastrate su terreno solido.

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



# Materiali e reagenti

- Colture pure di batteri PSB in terreno liquido Nutrient Broth
  - Piastre Petri di terreno solido PVK
  - Puntali sterili
  - Righello
  - Pennarello
- 



## Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Micropipetta
- Termostato



## Sicurezza

- Camice
  - Guanti
- 



## Tempo

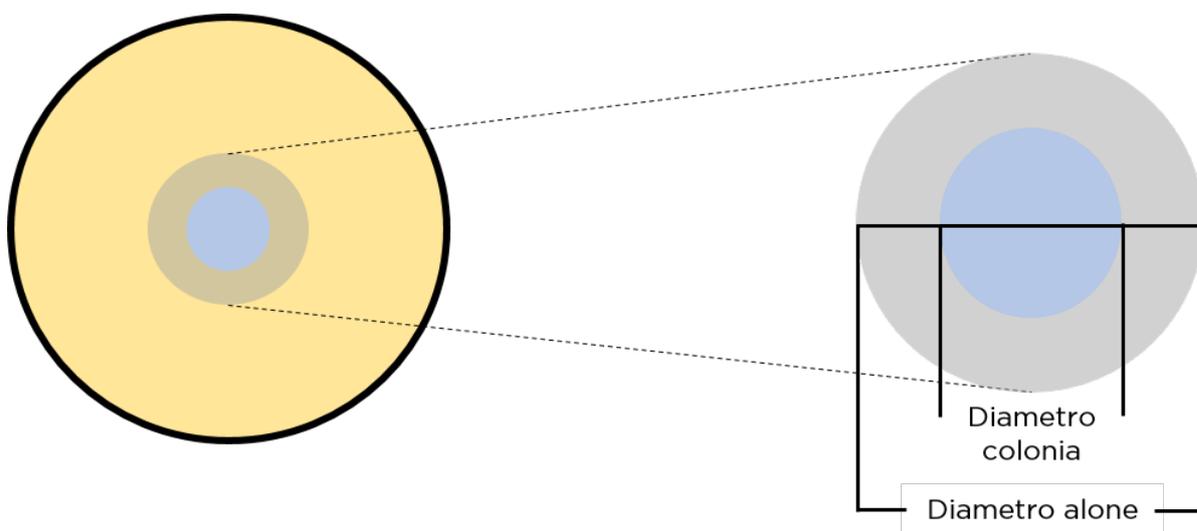
Circa 20 minuti per la semina e 72 ore per la crescita dei batteri  
20 minuti per le analisi



# Procedimento

- 1.** Il punto di partenza di questo protocollo sono le colture pure di batteri PSB, cresciute in terreno liquido Nutrient Broth e ottenute seguendo il protocollo “Isolamento in coltura pura di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)” della risorsa “Isolamento di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) da suoli agricoli”.
- 2.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e predisporre tante piastre di terreno solido PVK, preparate seguendo il protocollo della risorsa “Preparazione dei terreni per l’identificazione di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)”, quante sono le colonie batteriche isolate in terreno liquido Nutrient Broth. Numerare le piastre in ordine crescente e indicare anche il campione di suolo di partenza e la data.
- 3.** Preparare una piastra in più da usare come controllo negativo della capacità dei batteri PSB di solubilizzare il fosfato. Nominare la piastra come “Controllo” e indicare la data di semina.
- 4.** Con una micropipetta e un puntale sterile prelevare 10 µl di coltura liquida cresciuta nel tubo 1 e trasferirli nel centro della piastra di terreno solido PVK corrispondente, senza toccare la superficie del terreno con il puntale.
- 5.** Procedere in questa maniera per tutte le colture cresciute in terreno liquido Nutrient Broth, avendo cura di cambiare ogni volta il puntale sterile tra una coltura e l’altra.
- 6.** Terminata la semina, liberare la cappa biologica a flusso laminare dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l’ambiente interno con luce a raggi UV.
- 7.** Incubare le piastre in termostato a 37°C per 72 ore, senza capovolgere la piastra.

8. Terminata la crescita dei batteri PSB (ad eccezione della piastra di controllo), procedere con la determinazione dell'indice e dell'efficienza di solubilizzazione del fosfato presente nel terreno di coltura su cui i batteri sono stati fatti crescere:
- appoggiare sul coperchio della piastra un righello e misurare il diametro della colonia e dell'alone formatosi attorno alla colonia corrispondente;



- calcolare l'indice di solubilizzazione, applicando la seguente formula:

$$\text{Indice di solubilizzazione} = \frac{(\text{diametro colonia} + \text{diametro alone})}{\text{diametro colonia}}$$

- calcolare l'efficienza percentuale di solubilizzazione, applicando la seguente formula:

$$\text{Efficienza di solubilizzazione (\%)} = \frac{\text{diametro alone}}{\text{diametro colonia}} \times 100$$

9. Confrontare indice ed efficienza di solubilizzazione del fosfato tra colonie di batteri PSB isolate dai due campioni di suolo precedentemente raccolti, ovvero vite e ulivo, per conoscere quali batteri agiscono meglio.

## Note

- I batteri PSB sono microrganismi del suolo in grado di convertire forme insolubili del fosfato, introdotte nel terreno con fertilizzanti chimici, in molecole solubili facilmente assimilabili e utilizzabili dalle piante. Questa caratteristica dei batteri PSB può essere testata e misurata in vitro su terreni di coltura solidi contenenti fosfato di calcio, che viene solubilizzato e reso visibile attraverso la formazione di un alone trasparente intorno alla colonia.
- Diversi studi hanno dimostrato che il principale meccanismo alla base della solubilizzazione del fosfato e, di conseguenza, della formazione dell'alone trasparente intorno alla colonia è la produzione e secrezione di vari acidi organici, caratteristica che determina anche una diminuzione del pH (come mostrato nel protocollo "Osservare la diminuzione del pH nel terreno dei batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)").
- La valutazione della solubilizzazione del fosfato descritta in questo protocollo rappresenta un metodo di facile e veloce applicazione, ma fornisce un dato qualitativo che dovrà essere associato a una precisa quantificazione spettrofotometrica del fosfato solubilizzato.
- 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 Battaglioni di Taranto ha osservato che l'alone è più evidente in piastre con terreno PVK. Per questa esperienza viene, quindi, privilegiato l'utilizzo del terreno PVK.
- In questo protocollo la goccia di colonia liquida viene rilasciata nel centro della piastra, senza procedere con la sua piastratura per striscio o per spatolamento. Non capovolgere la piastra di coltura al momento della crescita batterica in termostato, per evitare che la goccia si sposti sul terreno, rendendo difficile la misurazione dell'alone prodotto.
- 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 nei protocolli della risorsa "Isolamento di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) da suoli agricoli".