

Isolamento di **batteri PSB** (Phosphate Solubilizing Bacteria) da **suoli agricoli**

Obiettivo Isolare da suoli agricoli di ulivo e di vite, concimati con fertilizzanti a base di fosfato, i batteri PSB in grado di convertire i composti del fosforo in forme solubili e più facilmente assimilabili dalle piante.

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



Materiali e reagenti

- Campioni di suolo agricolo di ulivo e di vite
- Spatole
- Navicelle da pesata o carta stagnola
- Acqua deionizzata sterile
- Tubi da 15 ml sterili
- Piastre Petri di terreno solido PVK
- Anse a L sterili monouso
- Pipette sterili
- Puntali sterili
- Pennarello



Strumenti

- Setaccio con maglie da 1 mm
- Base di raccoglimento
- Bilancia
- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Pipettatore manuale o automatico
- Micropipette
- Vortex
- Termostato



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

Circa 40 minuti per la semina dei batteri PSB e 3-4 giorni per la loro crescita



Procedimento

- 1.** Setacciare il campione di suolo agricolo di ulivo e di vite, raccolti seguendo il protocollo “Campionamento di suoli agricoli per la ricerca di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)” nella sezione “Scienze naturali”, utilizzando un setaccio con maglie da 1 mm e la sua base di raccoglimento. Compiere dei movimenti vibratorii e circolari vigorosi per favorire il passaggio dei granelli di terreno con diametro inferiore a 1 mm nella base di raccoglimento.
- 2.** Con una bilancia, pesare 1 g di ogni campione di suolo setacciato, aiutandosi con spatole e con navicelle da pesata.
- 3.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale tutto il materiale necessario.
- 4.** Sotto cappa biologica, preparare per ogni campione di suolo otto tubi sterili da 15 ml per allestire le diluizioni seriali. Numerare i tubi in ordine progressivo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) e indicare il tipo di suolo in esame.
- 5.** Con una pipetta trasferire 9 ml di acqua deionizzata sterile in ogni tubo preparato al punto precedente.
- 6.** Nel tubo 1, dissolvere il campione di suolo di ulivo setacciato e pesato. Chiudere il tappo e mescolare con un vortex. Il campione di suolo è stato così diluito 1:10 (diluizione 10^{-1}).
- 7.** Nel tubo 2, trasferire con un puntale sterile 1 ml di soluzione presente nel tubo 1. Chiudere il tappo e mescolare con un vortex. Si è così ottenuta una soluzione diluita 1:100 (diluizione 10^{-2}).
- 8.** Ripetere il procedimento per tutte le restanti diluizioni: trasferire 1 ml di soluzione dal tubo 2 al tubo 3 (diluizione 10^{-3}), dal tubo 3 al 4 (diluizione 10^{-4}), dal tubo 4 al 5 (diluizione 10^{-5}) e così avanti fino ad ottenere la diluizione 10^{-8} nel tubo 8. Tra una diluizione e quella successiva, utilizzare sempre un nuovo puntale sterile e mescolare ogni soluzione con un vortex.

9. Procurarsi otto piastre Petri 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 diluizioni da seminare. Numerare le piastre in modo progressivo da 1 a 8 e segnare sul bordo della piastra la diluizione piastrata, il campione di suolo in esame e la data di semina.
10. Procurarsi anche una piastra aggiuntiva di terreno solido PVK da utilizzare come controllo negativo. Nominare la piastra “Controllo” e segnare sul bordo della piastra la data.
11. Continuando a lavorare sotto cappa biologica, trasferire con un puntale sterile 100 µl della diluizione 10^{-1} (tubo 1) nel centro della piastra 1, facendo attenzione a non toccare il terreno con il puntale. Con un’ansa a L sterile distribuire uniformemente la soluzione sulla superficie del terreno fino a completo assorbimento.
12. Piastrare le diluizioni successive, ricordandosi di cambiare sempre il puntale: trasferire 100 µl di soluzione diluita 10^{-2} (tubo 2) nel centro della piastra 2, 100 µl di soluzione diluita 10^{-3} (tubo 3) nella piastra 3 e così via fino ad aver seminato anche la diluizione 10^{-8} (tubo 8) nella piastra 8. Dopo ogni trasferimento, distribuire la soluzione con un’ansa a L sterile. Cambiare ansa ad ogni piastra.
13. Ripetere i passaggi dal punto 6 al punto 12 per seminare anche le diluizioni del campione di suolo di vigneto.
14. Al termine delle operazioni, 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.
15. Incubare le piastre per 3-4 giorni in un termostato con temperatura impostata a 37°C.
16. Al termine della crescita, identificare i batteri che mostrano la formazione di un alone, indice della solubilizzazione del fosfato, e procedere con l’isolamento in coltura pura, secondo il protocollo “Isolamento in coltura pura di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)”. Effettuare il riconoscimento solo nelle piastre i cui campioni biologici sono stati diluiti maggiormente (10^{-7} e/o 10^{-8}), in quanto è più facile trovare colonie batteriche separate tra di loro e con un alone ben visibile. In alternativa conservare le piastre a 4°C per un paio di settimane, rivestendo i bordi della piastra con il Parafilm®.

Note

- *Per gli organismi vegetali, il fosforo è uno dei più importanti macronutrienti, dopo l'azoto, ed è coinvolto in una serie di processi cellulari, come la fotosintesi, la trasduzione del segnale e la produzione di energia. Tuttavia, la concentrazione di fosforo nei suoli è molto bassa, caratteristica che richiede l'utilizzo di fertilizzanti chimici a base di fosfati per rispondere alla sempre più crescente domanda di raccolto. I fertilizzanti chimici rilasciano nel suolo anche fosfati non assimilabili da parte delle piante, che si accumulano causando effetti negativi sulla catena alimentare, l'eutrofizzazione e la distruzione delle comunità di microrganismi del suolo. Inoltre, la continua produzione di fertilizzanti chimici causa la riduzione delle riserve mondiali di fosforo.*
- *I batteri PSB giocano un ruolo fondamentale nella risoluzione del problema della carenza di fosforo nei suoli agricoli, in quanto questi microrganismi sono in grado di convertire le forme insolubili dei fosfati presenti nel terreno in forme facilmente assimilabili e utilizzabili dalle piante, attraverso meccanismi di secrezione enzimatica e di acidi organici e processi chelanti.*
- *Il terreno PVK e il terreno Sperber possono essere entrambi impiegati 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 in piastre con terreno PVK. Viene, quindi, privilegiato l'utilizzo del terreno PVK, ma nulla vieta che questo protocollo possa essere eseguito anche su terreno solido Sperber.*
- *Non è necessario far essiccare all'aria i campioni di suolo raccolti, per cui è possibile iniziare questo protocollo direttamente dalla setacciatura.*
- *Il restante campione di terreno setacciato, ma non utilizzato per l'esecuzione dell'attività, non può essere conservato a 4°C o congelato ma deve essere eliminato. Il fatto di setacciare una quantità di suolo in eccesso rispetto al grammo che viene successivamente pesato deriva dal fatto che è necessario avere un campione di suolo rappresentativo del terreno in esame per l'esperimento.*
- *Piastrare tutte le diluizioni su terreno solido ha una valenza prevalentemente didattica: permette, infatti, di visualizzare come cambia la concentrazione dei batteri, che sarà molto elevata nella piastra 1 e a mano a mano più ridotta nelle piastre successive. L'identificazione dei batteri PSB mediante formazione dell'alone, quindi, sarà di più facile realizzazione nelle piastre a ridotta concentrazione. Le piastre in cui è stata seminata un'alta concentrazione batterica possono essere eliminate.*
- *Per ridurre il numero delle anse a L monouso utilizzate, è possibile piastrare le diluizioni dei campioni di uno stesso suolo partendo da quelle più diluite (tubo 8) a quelle meno diluite (tubo 1). Così facendo si limita il consumo di materiale, evitando allo stesso tempo di contaminare i campioni poiché si procede dal campione più diluito a quello più concentrato.*
- *Per impedire la contaminazione da parte di altri batteri, le operazioni vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare. In alternativa è possibile utilizzare un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e la fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino a cui effettuare la semina. Inoltre, è importante che tutti i materiali utilizzati per l'esecuzione di questo protocollo sperimentale siano sterili o monouso, dai tubi alle pipette graduate, dai puntali alle anse a L.*
- *Non è sicuro accendere la fiamma del becco Bunsen sotto la cappa biologica, per cui la semina sotto cappa deve essere effettuata esclusivamente con anse a L sterili monouso.*
- *Se, invece, si effettua la semina sul banco da laboratorio in presenza di un becco Bunsen, è possibile utilizzare anse in acciaio inox. In questo caso, prima di procedere alla semina:*
 - *sterilizzare l'ansa a L sulla fiamma del becco Bunsen e farla raffreddare all'aria;*
 - *trasferire e distribuire uniformemente la diluizione batterica;*
 - *ripetere i punti precedenti per ogni nuova diluizione da seminare.*
- *Nel lavorare sotto cappa biologica, l'operatore deve adottare alcuni accorgimenti per garantire la sterilità dell'ambiente:*
 - *il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria;*
 - *non sovraccaricare il piano di lavoro con troppo materiale;*
 - *disinfettare con Etanolo 70% tutto il materiale necessario allo svolgimento dell'attività, prima di inserirlo sotto cappa;*
 - *evitare di mantenere aperti i tubi e le piastre di coltura, oltre il tempo necessario alla semina del materiale biologico.*