

Osservare la  
**diminuzione** del **pH**  
nel terreno dei **batteri PSB**  
(Phosphate Solubilizing  
Bacteria)

**Obiettivo** Verificare la capacità dei batteri PSB di produrre, durante il processo di solubilizzazione del fosfato, acidi organici con conseguente abbassamento del pH, evidenziato dal viraggio del terreno solido WL da blu-verde petrolio a giallo.

**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 WL
  - Puntali sterili
  - Pennarello
- 



## Strumenti

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



## Sicurezza

- Camice
  - Guanti
- 



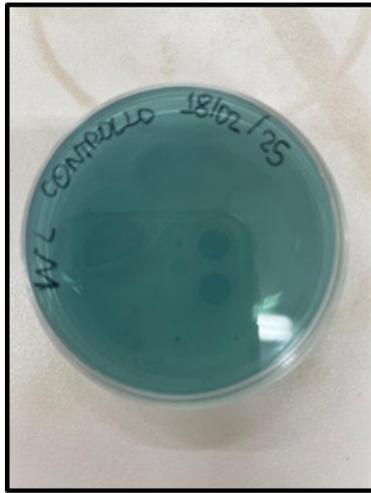
## Tempo

Circa 20 minuti per la semina dei batteri e 3-4 giorni per la loro crescita  
10 minuti per l'analisi del risultato

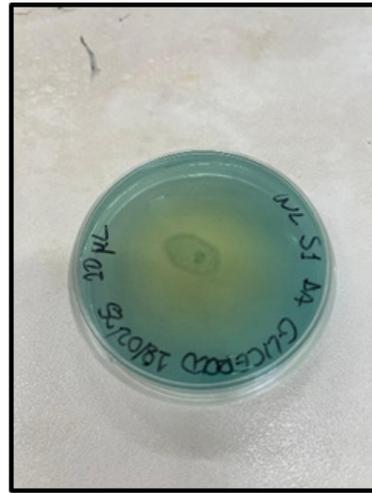


# Procedimento

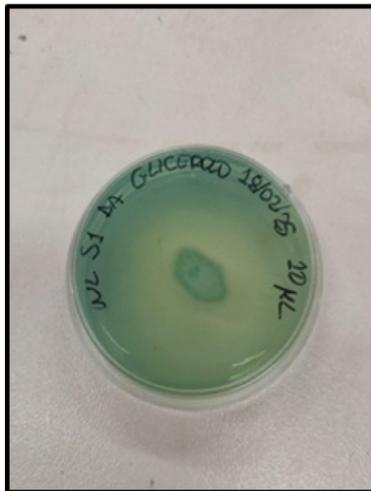
- 1.** Il punto di partenza di questa attività sperimentale sono le colture pure di batteri PSB, cresciute in terreno liquido Nutrient Broth e ottenute seguendo il protocollo “Isolamento in coltura pura di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)” della risorsa “Isolamento di batteri PSB (Phosphate 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 WL, preparate seguendo il protocollo “Preparazione del terreno WL solido” (senza le aggiunte di Ampicillina e Bifenile previste al punto 8 del protocollo), quante sono le colonie batteriche isolate in terreno liquido Nutrient Broth. Numerare le piastre in ordine crescente e indicare il campione di suolo di partenza e la data.
- 3.** Preparare una piastra in più da usare come controllo negativo del viraggio del pH del terreno. Nominare la piastra come “Controllo” e indicare la data.
- 4.** Con una micropipetta dotata di un puntale sterile prelevare 10  $\mu$ l di coltura liquida cresciuta nel tubo 1 e trasferirli nel centro della piastra di terreno solido WL 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 tra una coltura e l'altra.
- 6.** 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.
- 7.** Incubare le piastre a 37°C per 72 ore, senza capovolgere la piastra.
- 8.** Terminata l'incubazione, osservare il cambiamento di colore del terreno WL, indice dell'abbassamento del pH (come mostrato nell'immagine della pagina successiva). La sequenza di immagini sottostanti mostra come il viraggio del pH del terreno si espande con l'aumentare del tempo di incubazione.



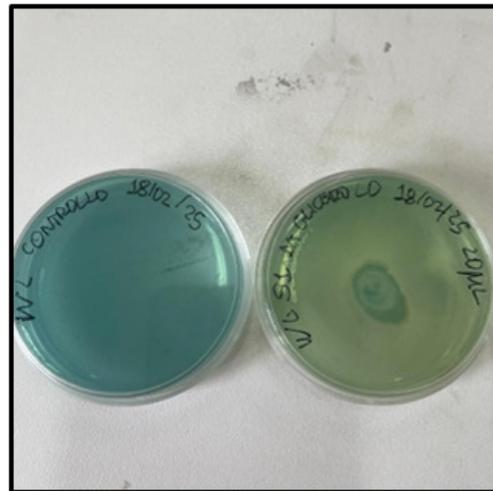
*Piastra di controllo in cui **non** sono stati piastrati i batteri PSB.*



*Diminuzione del pH del terreno dopo 24 ore d'incubazione con batteri PSB.*



*Diminuzione del pH del terreno dopo 48 ore d'incubazione con batteri PSB.*



*Diminuzione del pH del terreno dopo 72 ore d'incubazione con batteri PSB (piastra a destra) rispetto al controllo (piastra a sinistra).*

## Note

- *Diversi studi hanno dimostrato che la solubilizzazione del fosfato da parte dei batteri PSB è associata alla produzione e secrezione di vari acidi organici, come acido acetico, acido fumarico, acido tartarico, acido glutammico e tanti altri, con conseguente diminuzione del pH. Al link sottostante è possibile scaricare una review per conoscere la distribuzione, le specie dei batteri PSB, ma anche i meccanismi alla base delle loro attività: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38138048/>.*
- *Il team di docenti di scienze del Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto ha, quindi, ideato questa esperienza per l'osservazione qualitativa della diminuzione del pH del terreno in cui i batteri PSB sono fatti crescere. Per ottenere il risultato è stato scelto il terreno WL, in quanto nella sua composizione è presente il verde di bromocresolo, un indicatore di pH. Per altre informazioni sulla composizione del terreno WL leggere il protocollo "Preparazione del terreno WL solido".*
- *L'intervallo di viraggio del verde di bromocresolo si attesta tra valori di pH compresi tra 3,8, in cui assume colorazione verde-giallo paglierino, a 5,4, la cui colorazione passa al blu-verde petrolio.*
- *Il team di docenti di scienze del Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto ha anche notato la comparsa di bollicine nella colonia di batteri piastrati e la rottura del terreno di coltura, come mostrato nell'immagine a lato. La spiegazione alla base di questo fenomeno, sperimentata anche in altri laboratori di ricerca come si legge nella review di cui sopra, potrebbe essere la produzione di CO<sub>2</sub>.*
- *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 e fare attenzione agli spostamenti per evitare che la goccia si sposti sulla superficie del terreno.*
- *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".*

