

Isolamento di **microrganismi** del suolo associati a radici di **Elicriso**

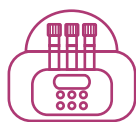
Obiettivo Isolare e selezionare microrganismi del suolo associati alla rizosfera di Elicriso in un sito minerario contaminato da metalli pesanti.

Autore IIS Marconi-Lussu di San Gavino Monreale (SU)
Secondo classificato Mad for Science 2022
Progetto “Elicriso: il fiore del Sole, rimedio e risorsa”



Materiali e reagenti

- Paletta d'acciaio sterile
- Tubi da 15 e 50 ml sterili
- Soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%)
- Beute sterili da 100 ml
- Piastre Petri di terreno LB agar (addizionato con solfato di zinco)
- Puntali sterili
- Anse a L sterili monouso
- Ancoretta magnetica
- Parafilm®
- Pennarello indelebile



Strumenti

- Bilancia tecnica
- Cappa biologica a flusso
- Piastra magnetica
- Micropipette
- Termostato



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

Circa due ore e mezza per il distacco dei batteri dal suolo e il loro inoculo
3-7 giorni per la crescita dei batteri



Procedimento

- 1.** Identificare un sito idoneo e procedere alla raccolta del terreno a contatto con le radici di piante di Elicriso spontaneamente presenti. Nel caso di questo protocollo è stato utilizzato il suolo di un sito minerario contaminato da metalli pesanti.
- 2.** Selezionare esemplari di Elicriso distanti almeno 2 metri l'uno dall'altro e procedere, per ogni pianta, al prelievo di due campioni di suolo indipendenti (circa 10 g ciascuno). Scavare delicatamente con una paletta d'acciaio sterile, idonea al trasferimento diretto del terreno in tubi da 50 ml sterili.
- 3.** Marcare i tubi con un pennarello indelebile, riportando la data di prelievo e utilizzando, per ciascuna pianta, una numerazione progressiva seguita da una lettera per identificare i replicati (es. 1A, 1B per la prima pianta; 2A, 2B per la seconda pianta e così via). Assicurarsi che i tubi contenenti i campioni non siano chiusi ermeticamente.
- 4.** Durante il trasporto, i campioni possono essere mantenuti a temperatura ambiente ed utilizzati nel più breve tempo possibile. In alternativa, conservarli a +4 °C fino all'utilizzo avendo cura di tenere il tappo del tubo leggermente svitato per garantire l'aerazione del campione.
- 5.** In laboratorio, sotto cappa biologica a flusso laminare, pesare per ciascun campione 5 g di suolo e trasferirli in una beuta sterile da 100 ml contenente 45 ml di soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%). La restante aliquota di campione può essere conservata a +4 °C per eventuali analisi successive ricordandosi di tenere il tappo del tubo leggermente svitato.
- 6.** Inserire un'ancoretta magnetica sterile in ciascuna beuta e trasferirle su piastra magnetica a 200 rpm. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente, al fine di favorire il distacco dei microrganismi dalle particelle di suolo.
- 7.** Per ciascuna beuta, preparare tre tubi sterili da 15 ml per l'allestimento delle diluizioni seriali. Marcare i tubi con pennarello indelebile, riportando il codice del campione (numero e lettera) seguito dalla diluizione corrispondente (1:10, 1:100, 1:1000).
- 8.** Con una pipetta trasferire 9 ml di soluzione fisiologica sterile in ciascuno dei tre tubi.

9. Nel tubo corrispondente alla diluizione 1:10, aggiungere 1 ml di sospensione prelevata dalla beuta al termine dell'agitazione, utilizzando puntali sterili da 1000 µl. Chiudere il tappo e agitare per inversione alcune volte oppure mescolare a bassa velocità con un vortex.
10. Nel tubo corrispondente alla diluizione 1:100, trasferire 1 ml della diluizione 1:10 utilizzando puntali sterili da 1000 µl. Chiudere il tappo e agitare per inversione alcune volte oppure mescolare a bassa velocità con un vortex. Si è così ottenuta una soluzione diluita 100 volte rispetto alla sospensione iniziale presente nella beuta.
11. Nel tubo corrispondente alla diluizione 1:1000, trasferire 1 ml della diluizione 1:100 utilizzando puntali sterili da 1000 µl. Chiudere il tappo e agitare per inversione alcune volte oppure mescolare a bassa velocità con un vortex. Si è così ottenuta una soluzione diluita 1.000 volte rispetto alla sospensione iniziale presente nella beuta.
12. Predisporre 12 piastre Petri di terreno solido LB, preparate secondo il protocollo "Preparazione del terreno LB solido con zinco per batteri resistenti ai metalli". Il numero di piastre da preparare dipende dal numero di campioni e diluizioni da analizzare. Ad esempio, considerando 2 piante campionate in duplicato (4 campioni totali) e 3 diluizioni per ciascun campione (1:10, 1:100, 1:1000), saranno necessarie 12 piastre.
13. Marcare ciascuna piastra con il codice del campione (numero e lettera), la diluizione e la data di inoculo.
14. Sotto cappa biologica a flusso laminare, seminare sulle piastre Petri circa 30 µL di ciascuna diluizione e distribuire uniformemente il campione utilizzando un'ansa a L sterile.
15. Porre le piastre nel termostato con temperatura impostata a 28 °C per un periodo di 3-7 giorni e valutare giornalmente la crescita microbica.
16. Al termine della crescita, le colonie batteriche possono essere prelevate e inoculate in terreno liquido LB addizionato con metalli pesanti, al fine di ottenere colture pure e procedere con ulteriori test di caratterizzazione microbiologica.
17. Le piastre possono essere conservate a +4 °C per un breve periodo (alcuni giorni), sigillate con Parafilm®. Per una conservazione più prolungata seguire il protocollo "Crioconservazione di ceppi batterici in glicerolo" nella sezione "Microbiologia".



Colonie batteriche (diluizione 1:10) in terreno LB agar, contenente solfato di zinco eptaidrato 5 mM, dopo 3 giorni di incubazione.

Note

- Nella fase di raccolta del suolo, si consiglia di scegliere la distanza tra le piante in funzione della specie vegetale e dell'estensione dell'apparato radicale. Per le piante di Elicriso può essere sufficiente una distanza di 1-2 metri tra un esemplare e l'altro, mentre per piante come Euforbia o Lentisco, caratterizzate da dimensioni maggiori e da un apparato radicale più sviluppato, è opportuno selezionare esemplari distanti almeno 5 metri.
- Per aumentare la probabilità di isolamento dei batteri, durante la raccolta è possibile prelevare un piccolo frammento (circa 1-2 cm) di apparato radicale insieme al terreno.
- Si consiglia di eseguire l'esperimento in duplicato poiché il substrato può essere molto eterogeneo dal punto di vista granulometrico e contenere quantità molto variabili di microrganismi.
- Tutti i materiali utilizzati nelle fasi di laboratorio (tubi, beute, puntali) devono essere sterili e le operazioni di isolamento dei microrganismi devono essere svolte sotto cappa biologica a flusso laminare per evitare contaminazioni.
- Durante il prelievo della sospensione di suolo dalla beuta e le successive operazioni di semina, lavorare rapidamente per limitare la sedimentazione dei microrganismi. Qualora il puntale si ostruisca a causa dell'elevata granulometria del suolo, utilizzare puntali modificati (estremità tagliata e successivamente sterilizzati). Assicurarsi, infine, che la sospensione sia distribuita uniformemente sulla superficie dell'agar, al fine di ottenere colonie ben isolate.
- Capovolgere le piastre durante l'incubazione per evitare la formazione di condensa sulla superficie dell'LB agar.
- Il protocollo prevede un'incubazione fino a 7 giorni; tuttavia, la comparsa delle prime colonie è generalmente osservabile già dopo 3 giorni con tempistiche che possono variare in funzione della specie batterica isolata.
- Al termine dell'incubazione è possibile valutare quantitativamente la crescita microbica effettuando il conteggio delle unità formanti colonia (CFU). Se disponibile, il conteggio può essere eseguito utilizzando un conta colonie, osservando la piastra e contando le colonie visibili. Durante la conta, è importante evitare di contare più volte la stessa colonia. A tal fine, può essere d'aiuto suddividere visivamente la piastra in quadranti o utilizzare uno sfondo a griglia, procedendo in modo ordinato. È inoltre possibile segnare le colonie già contate sul fondo della piastra per facilitare l'operazione. Una volta ultimata la conta si può stimare il numero di microrganismi presenti nel campione iniziale applicando la seguente formula: $CFU/mL = \text{numero di colonie} \times \text{fattore di diluizione}$ (es. 45 colonie individuate nella diluizione 1:100 corrispondono a 4500 CFU/ml nel campione iniziale).
- Le colonie isolate possono essere sottoposte a colorazione di Gram, secondo quanto descritto nel protocollo "Colorazione di Gram" disponibile nella sezione "Microscopia e Istologia", al fine di distinguere i batteri Gram-positivi dai Gram-negativi. Inoltre, è possibile procedere all'estrazione del DNA genomico delle colonie isolate, seguita da caratterizzazione genetica mediante PCR del gene 16S rRNA.