

# Preparazione del terreno **LB solido con zinco** per batteri resistenti ai **metalli**

**Obiettivo** Preparare il terreno LB agar addizionato con concentrazioni crescenti di zinco per lo studio di ceppi batterici in grado di crescere in presenza di metalli.

**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

- 5 bottiglie da 250 ml resistenti al calore
- Solfato di zinco eptaidrato in soluzione acquosa (0.1M)
- Acqua deionizzata
- Scotch da autoclave
- NaOH 2M (eventuale)
- Siringhe da 5 ml
- Filtri da 0.22  $\mu\text{m}$
- NaCl, Estratto di lievito, Triptone e Agar in polvere
- Piastre Petri sterili monouso da 90mm
- Pipette Pasteur e Pipette serologiche sterili
- Cilindri da 100 ml sterili
- 4 Becher da 250 ml sterili
- Parafilm® e Pennarello indelebile



## Strumenti

- Bilancia tecnica
- Piastra magnetica
- Autoclave
- Cappa biologica a flusso
- Pipettatore automatico



## Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



## Tempo

50 minuti per la preparazione della soluzione di solfato di zinco 100mM (compresa la sterilizzazione)

Circa due ore per la preparazione delle piastre (compresa la sterilizzazione e la solidificazione del terreno)



# Procedimento

1. Utilizzare una soluzione di solfato di zinco (0.1M) di origine commerciale come soluzione stock per le diluizioni successive. Trasferire un'aliquota della soluzione in una bottiglia resistente al calore. Marcare la bottiglia con nastro da autoclave e riportare la dicitura "stock solfato di zinco 100mM" insieme alla data di preparazione. Sterilizzare la soluzione in autoclave a 121°C per 20 minuti assicurandosi che il tappo non sia chiuso ermeticamente.
2. Preparare una soluzione NaOH 2M e sterilizzarla con filtro da 0.22 µm.
3. Predisporre quattro bottiglie da 250 ml resistenti al calore per ciascun terreno da preparare con concentrazioni crescenti di solfato di zinco. Marcare le bottiglie riportando la data di preparazione e indicando "C" per il controllo (che non conterrà solfato di zinco) e numerandole progressivamente (1, 2, 3) in funzione della concentrazione del metallo che conterranno (come indicato in tabella).
4. Preparare quattro becher da 200 ml e marcarli con gli stessi codici delle bottiglie di destinazione ("C",1,2,3). Con una bilancia tecnica e navicelle da pesata, pesare 0.9 g di NaCl e triptone, 0.45 g di estratto di lievito, 1.35 g di agar e trasferirle nei becher. Aggiungere con un cilindro da 100 ml sterile i volumi di acqua deionizzata indicati in tabella. Per le bottiglie 1, 2 e 3 che conterranno solfato di zinco, il volume finale di 90 ml sarà raggiunto successivamente con l'aggiunta della soluzione stock 100mM.

BOTTIGLIA	CONCENTRAZIONE DI SOLFATO DI ZINCO	ACQUA DEIONIZZATA (ml)
Controllo (C)	0 mM	90
Bottiglia 1	5 mM	85.5
Bottiglia 2	10 mM	81
Bottiglia 3	20 mM	72

5. Inserire un'ancoretta magnetica sterile in ciascun becher e porlo su piastra magnetica (150-200 rpm) fino alla completa dissoluzione delle polveri. Trasferire le soluzioni ottenute nelle bottiglie precedentemente marcate e applicare lo scotch da autoclave per la successiva sterilizzazione.
6. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti, assicurandosi che il tappo non sia chiuso ermeticamente.
7. Al termine del processo di sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno. Quando la temperatura è intorno ai 50°C e le bottiglie possono essere maneggiate senza scottarsi, aggiungere sotto cappa a flusso laminare, utilizzando un pipettatore automatico, i volumi di soluzione stock di solfato di zinco (100mM) riportati nella tabella seguente, al fine di ottenere le concentrazioni finali desiderate.

BOTTIGLIA	CONCENTRAZIONE DI SOLFATO DI ZINCO	SOLFATO DI ZINCO 100mM (ml)
Controllo (C)	0 mM	0
Bottiglia 1	5 mM	4.5
Bottiglia 2	10 mM	9
Bottiglia 3	20 mM	18

8. Agitare delicatamente e prelevare una goccia di terreno con una pipetta Pasteur sterile, versarla su una cartina tornasole per verificare che il pH sia compreso tra 8 e 9. Se necessario, aggiungere al terreno qualche goccia di soluzione NaOH 2M precedentemente preparata e sterilizzata.
9. Sotto cappa a flusso laminare, predisporre 16 piastre Petri sterili da 90 mm e suddividerle in 4 gruppi da 4 piastre ciascuno, corrispondenti alle diverse concentrazioni di solfato di zinco (0, 5mM, 10mM, 20mM). Marcare ciascuna piastra con un pennarello indelebile riportando la concentrazione di metallo corrispondente.
10. Sempre lavorando sotto cappa a flusso laminare, trasferire circa 20-25 ml di terreno nelle piastre Petri e lasciarlo raffreddare con il coperchio semichiuso per permettere la solidificazione dell'agar.
11. Conservare le piastre a +4 °C; se non utilizzate entro 2 giorni, sigillarle con Parafilm®. Le piastre possono essere conservate fino a sette giorni a +4°C.
12. Le piastre così preparate saranno utilizzate per la semina di microrganismi isolati da suolo, secondo quanto descritto nel protocollo "Isolamento di microrganismi del suolo associati a radici di Elicriso", per selezionare ceppi di batteri in grado di crescere in presenza di metalli pesanti come lo zinco.

## Note

- Questo protocollo permette di valutare la capacità dei batteri isolati dal suolo di crescere in presenza di metalli pesanti grazie alla loro coltura su terreno LB agar addizionato con concentrazioni crescenti di solfato di zinco. I batteri differiscono nella loro capacità di tollerare la presenza dei metalli pesanti: alcuni ceppi risultano più sensibili e sono inibiti nella crescita già a basse concentrazioni, mentre altri, più tolleranti, riescono a svilupparsi anche a concentrazioni più elevate. Con questa attività si possono confrontare diversi microrganismi isolati dal suolo e individuare quelli meglio adattati a vivere in condizioni di contaminazione da metalli pesanti.
- Per questa attività sperimentale è stata utilizzata una soluzione commerciale di solfato di zinco eptaidrato in acqua (0.1 mol/L) di Sigma-Aldrich® (codice prodotto: 1.08879), già pronta per l'uso come soluzione stock. In alternativa, è possibile acquistare il solfato di zinco eptaidrato ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) in polvere (Sigma-Aldrich® codice prodotto: 29253.260). Per esempio, per preparare una soluzione stock di  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  100mM, pesare 2.87 g di polvere e trasferirli, aiutandosi con una navicella da pesata, in un becher da 200 ml. Con un cilindro trasferire 100 ml di acqua deionizzata nel becher e mescolare la soluzione con una ancoretta su piastra magnetica (200 rpm) fino alla completa dissoluzione del sale. Trasferire la soluzione in una bottiglia da 250 ml resistente al calore. Si consiglia l'impiego di sali solubili, preferibilmente sotto forma di solfati, poiché si sciolgono facilmente e facilitano la preparazione del terreno.
- Il seguente protocollo può essere applicato anche ad altri metalli pesanti (Pb, Cd, Cu, Cr, Ni).
- Le soluzioni contenenti metalli pesanti devono essere smaltite in appositi contenitori per rifiuti speciali pericolosi (es. in HDPE), adeguatamente etichettati con l'indicazione del contenuto (es. "soluzione acquosa di zinco") e i relativi pittogrammi di pericolo, e successivamente conferite a una ditta specializzata nello smaltimento dei rifiuti chimici.
- Per evitare la formazione di precipitati nel terreno di coltura, si consiglia di aggiungere le soluzioni contenenti i metalli solo dopo la sterilizzazione in autoclave. Dopo l'aggiunta, ricordarsi di mescolare accuratamente per assicurare una distribuzione omogenea del metallo nel terreno.
- Colare il terreno LB agar nelle piastre Petri quando ha raggiunto una temperatura di circa 50 °C, in modo da poter maneggiare le bottiglie in sicurezza senza rischio di scottature; operare rapidamente poiché il terreno solidifica al di sotto dei 45 °C.
- Le piastre contenenti batteri devono essere decontaminate inserendole in appositi sacchetti e autoclavandole a 121 °C per 20 minuti, al fine di garantire l'inattivazione completa dei microrganismi; solo successivamente possono essere smaltite nei rifiuti indifferenziati. Tuttavia, se le piastre contengono solfato di zinco nel terreno devono essere trattate come rifiuti chimici (o rifiuti speciali), seguendo le procedure previste per questo tipo di smaltimento.
- Manipolare la soluzione di NaOH 2M con cautela, in quanto corrosiva, indossando guanti in nitrile, occhiali di protezione e camice da laboratorio. La soluzione deve essere conservata in appositi contenitori (es. in polietilene) adeguatamente etichettati; eventuali residui, ad esempio al termine dell'utilizzo per l'aggiustamento del pH, devono essere smaltiti tramite ditta specializzata.
- Il mantenimento di un pH basico consente di limitare la crescita di lieviti e muffe, che possono essere naturalmente presenti nei campioni di suolo.