

# ALLESTIMENTO DI COLTURE BATTERICHE CON DIVERSE TECNICHE DI SEMINA



a cura di Massimo Trauzzola e Rossana Baglioni

## OBIETTIVO:

Acquisire la corretta manualità nelle varie tecniche di semina e la consapevolezza degli scopi per i quali la semina viene effettuata.

## MATERIALI E STRUMENTI:

### MATERIALI BIOLOGICI

Colture microbiche

### TERRENI DI COLTURA

Terreni di coltura liofilizzati (Nutrient agar, TSA, TSB, Nutrient broth, Gelatina)

### VETRERIA, ...

Piastre Petri sterili, pipette graduate sterili, provettoni, provette, tamponi faringei sterili, spatole sterili, anse, aghi, cilindri

### STRUMENTI

Bilancia, autoclave, termostato, bunsen



## UTILIZZO DEI TERRENI DI COLTURA DISIDRATATI

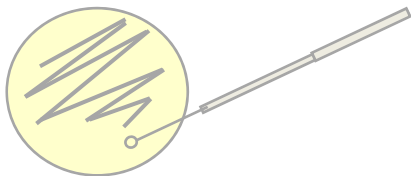
### Solubilizzazione:

pesare il terreno e porlo in una beuta e aggiungere la metà del volume di acqua distillata richiesta. Agitare per solubilizzare poi aggiungere l'acqua rimanente lavando le pareti della beuta. Utilizzare sempre beute di volume almeno 2 volte e mezzo quello della sospensione. Riscaldare per ottenere una completa solubilizzazione agitando continuamente fino ad arrivare all'ebollizione. La completa solubilizzazione dopo alcuni minuti di ebollizione, è indicata dalla trasparenza della soluzione.

## SEMINA IN TERRENO SOLIDO

1

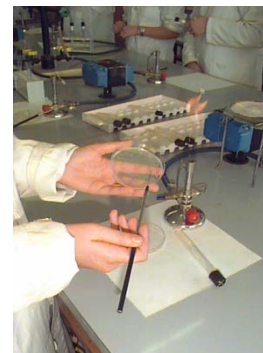
### Tecnica di trasferimento per striscio su piastra (a)



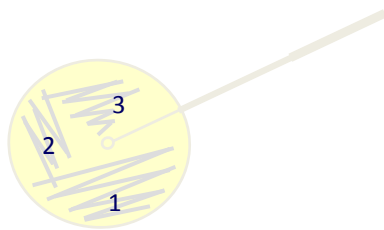
Operare in ambiente sterile, passare l'ansa alla fiamma e, dopo averla raffreddata, prelevare un po' di patina batterica da una piastra o da una provetta. Trasferire il materiale su una piastra sterile strisciando l'ansa con movimenti ampi a zig-zag senza incidere il terreno, non tornare sui punti già seminati. Sterilizzare l'ansa dopo l'uso.



La crescita si manifesta con formazione di colonie confluenti e isolate presenti sulla superficie dell'agar.



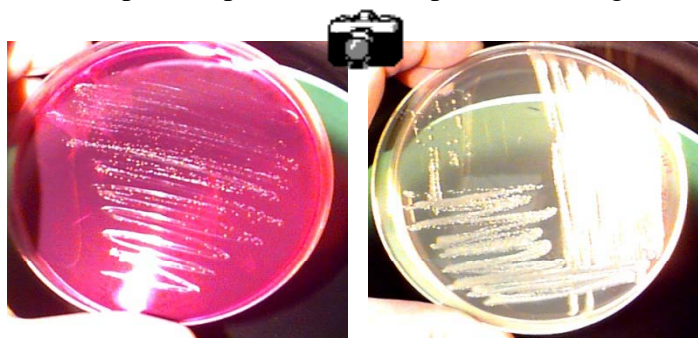
## 2 Tecnica di trasferimento per striscio su piastra (b)



Sempre operando in ambiente sterile, passare l'ansa alla fiamma e, dopo averla raffreddata, prelevare un po' di patina batterica. Trasferire il materiale su una piastra sterile strisciando l'ansa con movimenti a zig-zag senza incidere il terreno solo su metà piastra (1). Sterilizzare e raffreddare l'ansa, ruotare la piastra e riprendendo dal punto interrotto, strisciare l'altra metà della piastra (2); ripetere l'operazione un'altra volta in modo da ottenere tre strisci in tre diverse direzioni (3).

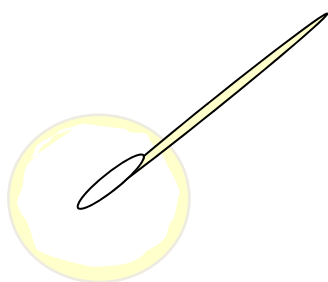


La crescita si manifesta con formazione di colonie confluenti nella prima metà e isolate nella seconda metà della piastra, presenti sulla superficie dell'agar.



## SEMINA IN TERRENO SOLIDO

### 1 Tecnica di trasferimento per striscio su piastra (c)



Nel caso in cui si voglia ottenere una crescita compatta, si può effettuare lo striscio con tamponi sterili che vengono passati più volte e in più direzioni sul terreno. Immergere un tampone in un brodo e trasferire il materiale su una piastra sterile strisciando più volte sulla superficie. Ruotare la piastra e strisciare ancora; sterilizzare il tampone dopo l'uso.



La crescita si manifesta con formazione di una patina più o meno omogenea.



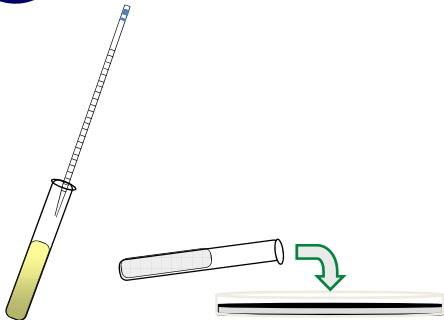
**2****Tecnica dello spatolamento in piastra (d)**

Operando sotto una cappa sterile o accanto alla fiamma del bunsen, prelevare con una pipetta sterile 0,1 ml di brodocoltura e trasferirlo al centro di una piastra con agar nutrient. Con una spatola sterile distribuire l'inoculo sulla superficie dell'agar in tutte le direzioni. Rovesciare la piastra ed incubarla a 28°-32° per 24-48h.

Deporre la spatola nell'apposito sacchetto per la sterilizzazione.



La crescita si manifesta con lo sviluppo di una patina presente sulla superficie dell'agar.

**SEMINA IN TERRENO SOLIDO****1****Tecnica della inclusione o diffusione in piastra (e)**

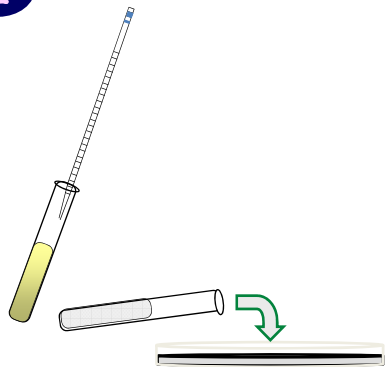
Nell'inclusione usiamo pipette sterili graduate per trasferire volumi precisi di inoculi nelle piastre. Successivamente si riempie la piastra con terreno di coltura sterile mantenuto fuso a b.m. a 45°C. Se la sospensione da seminare è concentrata, si procede ad una diluizione come nella sezione 4.1.



La crescita si manifesta con lo sviluppo di colonie isolate presenti sulla superficie dell'agar ma soprattutto in profondità.



## 2 Diluizione ed inclusione (f)



Diluire la brodocoltura quando è particolarmente concentrata procedendo ad una diluizione come nella sezione 4.1. Predisporre 4 piastre nelle quali verserete 1 ml di ogni diluizione preparata mettendo nella prima piastra l'inoculo concentrato (conc.  $10^0$ ). Versare il terreno sterile, mantenuto fuso a b.m., nelle piastre seminate, chiuderle e miscelare con un movimento rotatorio, lasciar solidificare.

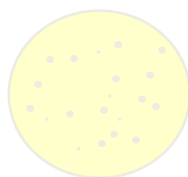
Le colonie crescono sia in superficie che in profondità e se la semina è stata fatta bene, le colonie saranno in progressiva diminuzione, di aspetto uniforme e più piccole dove il numero è maggiore.



Contaminazione



Bassa (+)



Media (++)



Alta (+++)



Altissima (++++)

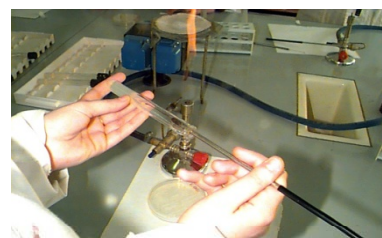
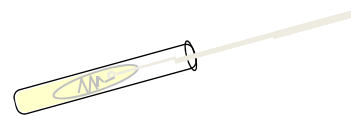
## SEMINA IN TERRENO SOLIDO

### 1 Tecnica di isolamento e striscio su "slant"

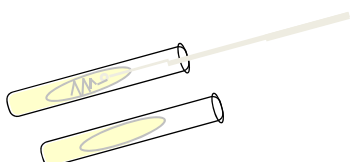
Operare in ambiente sterile, passare l'ansa alla fiamma e, dopo averla raffreddata, prelevare un po' di patina batterica da una piastra. Aprire e flambare la provetta, trasferire il materiale strisciando l'ansa con movimenti a zig-zag senza incidere il terreno partendo dal fondo della provetta. Sterilizzare l'ansa dopo l'uso.



La crescita si manifesta attraverso la presenza di veli o patina di consistenza cremosa o secca.



### 2 Tecnica di trasferimento per striscio da slant a slant (o "becco di clarino")



Sempre operando in ambiente sterile, passare l'ansa alla fiamma e raffreddarla. Impugnare le due provette con una mano, togliere i tappi e flambare l'imboccatura alla fiamma. Prelevare un po' di patina batterica dalla prima provetta, trasferire il materiale strisciando l'ansa con movimenti a zig-zag senza incidere il terreno partendo dal fondo della seconda provetta. Flambare e tappare le due provette. Sterilizzare l'ansa dopo l'uso.

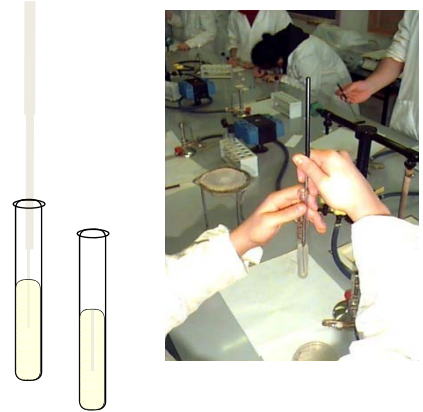


Anche qui la crescita si manifesta attraverso la presenza di veli o patina di consistenza cremosa o secca.

**3**

### Tecnica per infissione in agar o gelatina

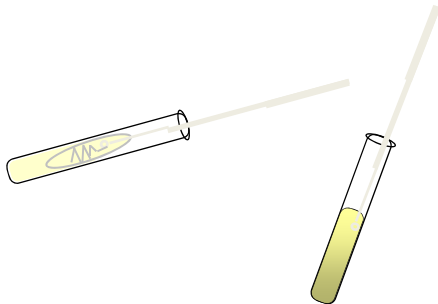
Si utilizza questa semina con un ago per inoculare terreni solidificati in provetta. L'ago consente di inserire le cellule lungo una linea verticale e in profondità, per permettere lo sviluppo dei batteri anaerobi e favorire l'osservazione di forme mobili che si diffondono a partire dalla linea dell'inoculo.



### SEMINA IN TERRENO LIQUIDO

**1**

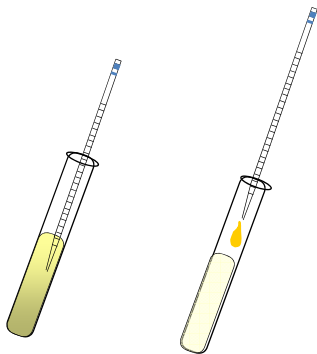
#### Tecnica di trasferimento da "slant" a brodo



Disporre le provette con il ceppo di *Escherichia Coli* e il brodo sterile da seminare vicino alla fiamma. Sterilizzare e raffreddare l'ansa, togliere i tappi dalle provette e flambarle. Prelevare con l'ansa un po' di patina batterica dallo slant, inserire l'ansa con l'inoculo nel brodo sterile e stemperare. Flambare e tappare le provette. Sterilizzare l'ansa dopo l'uso.

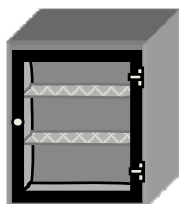
**2**

#### Tecnica di trasferimento mediante pipetta



La crescita in brodo si evidenzia a occhio nudo attraverso:

- intorbidamento del terreno;
- formazione di un sedimento sul fondo della provetta che agitato sale verso l'alto;
- formazione di fiocchi o granuli in sospensione.

**3**

Incubare i terreni seminati insieme ad alcuni non seminati, come controllo, a 37° per 24-48h