

EFFETTO DI DIVERSI FATTORI AMBIENTALI SULLA CRESCITA DEI MICRORGANISMI



a cura di Massimo Trauzzola e Rossana Baglioni

OBIETTIVO:

Verificare l'adattamento di alcune specie microbiche a condizioni differenti di ossigenazione e di pH del mezzo di crescita.

PRINCIPIO:

Ogni specie microbica presenta esigenze nutrizionali e colturali diverse. Variando in modo controllato alcuni fattori ambientali si può valutare la risposta di ciascuna specie microbica in esame attraverso l'osservazione della crescita in coltura.

MATERIALI E STRUMENTI:

MATERIALI BIOLOGICI

Brodocolture di *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccaromyces cerevisiae*

MATERIALI CHIMICI

Reattivi per anaerobiosi (catalizzatori, indicatori), cartina indicatrice (test a)

Soluzioni di HCl 1 M (100 ml), HCl 0,1 M (100 ml), NaOH 1 M (100 ml) e NaOH 0,1 M (100 ml) (test b)

TERRENI DI COLTURA

Glucose agar (test a) - TSB (test b)

VETRERIA, ...

Beute, cilindri, bacchette, provette, beker 100 ml, piastre sterili con setto, ansa, piastre sterili, pipette sterili da 1 ml

STRUMENTI

Bilancia, autoclave, termostato, giara per anaerobiosi, phmetro, bunsen

METODICA

test a) Influenza dell'ossigeno atmosferico sulla crescita

Ricerca di aerobi, anaerobi e anaerobi facoltativi

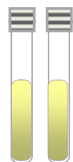
(1^a FASE 1° parte)

1



Sciogliere il terreno per una prova in doppio, più il controllo.

2



Distribuire in provette, controllare il pH con la cartina indicatrice e autoclavare.

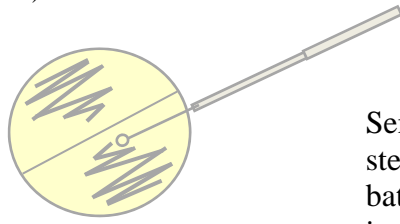
3



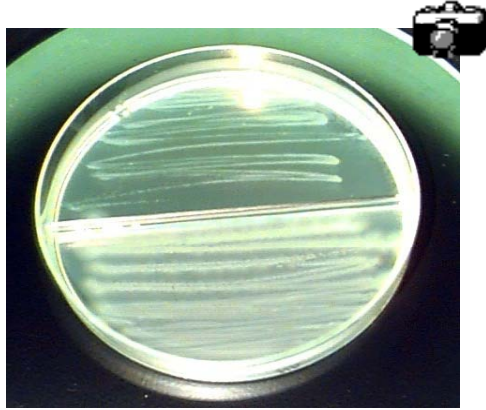
Piastrare e raffreddare il terreno.

(1ª FASE 2ª parte)

1



Seminare in ciascuna metà della piastra, in maniera sterile, mediante striscio, l'inoculo dei due ceppi batterici. Una piastra va messa in termostato e l'altra in giara.



Giara:

sistemare le piastre capovolte nella giara, inserire l'indicatore per anaerobiosi e il reattivo per eliminare l'ossigeno (il reattivo va attivato aggiungendo 10 ml di acqua nella bustina operando lontano dalla fiamma per la presenza di idrogeno altamente infiammabile); la reazione viene portata a termine in circa 60', dopodiché controllare la pressione nel manometro (1 atm. circa). Dopo 2-3 ore controllare se l'indicatore per l'anaerobiosi è virato al rosso.



Riporre la giara e la seconda serie di piastre in termostato a 37° per 48 h. Dopo incubazione aprire la giara sotto cappa, controllare la crescita nelle piastre e registrare i risultati secondo la seguente scala:

- = assenza di crescita
- + = crescita scarsa
- ++ = crescita normale
- +++ = crescita abbondante



NB: il catalizzatore è situato nell'apposita sede posta sotto il coperchio della giara; tra un impiego e l'altro va asciugato riscaldandolo in stufa a 160° per 90'.

METODICA

test b) Influenza del pH del mezzo sulla crescita

Si verifica l'influenza del pH sulla crescita coltivando i batteri in terreni in cui viene variato il pH per aggiunta di acidi o di basi.

(1ª FASE 1° parte)

1



Sciogliere il terreno, distribuirlo in 4 beute.

2



Preparare le soluzioni di HCl 1 M (100 ml), HCl 0,1 M (100 ml), NaOH 1 M (100 ml) e NaOH 0,1 M (100 ml) e correggere il pH in ognuna delle beute con i valori 3,0-4,5-7,0-9,0 controllandole con il phmetro.

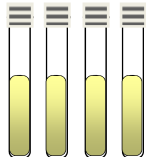
METODICA

PHMETRO

Accendere il pHmetro almeno 10' prima dell'uso ed effettuare la calibrazione. Selezionare il tasto pH e automatico, inserire l'elettrodo nel campione a pH 7. Pigiare il tasto cal e attendere che lo strumento si stabilizzi. Lavare e asciugare l'elettrodo e ripetere l'operazione con il campione a pH 4 o 10. Effettuare la lettura dei vari campioni pigiando il tasto read o = lavando accuratamente l'elettrodo tra una lettura e l'altra.



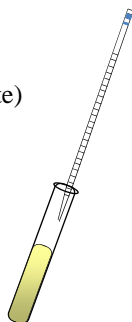
3



Distribuire 10 ml in ogni provetta in modo da ottenere 4 provette per ogni prova. Sterilizzare a 121° per 15' e ricontrollare infine il pH.

(1ª FASE 2° parte)

4



Seminare 1 ml delle due brodoculture in ogni provetta, incubare sia i tubi seminati che quelli non seminati a 36° per 24-48 h.

Controllare la crescita nei tubi e registrare i risultati secondo la seguente scala:

- = assenza di crescita
- + = crescita scarsa
- ++ = crescita normale
- +++ = crescita abbondante