

Semplici esperienze pratiche per introdurre lo studio della Microbiologia

LUCILLA DOLZANI*

Dipartimento di Scienze della Vita
Università di Trieste
ldolzani@units.it

SUNTO

Due semplici esperienze di laboratorio consentono agli studenti di scoprire il microscopico mondo invisibile che li circonda. La prima esperienza consiste nel coltivare i batteri normalmente presenti sulle superfici corporee e su piccoli oggetti, mentre la seconda punta a valutare il numero di batteri contenuti in una porzione di bevanda probiotica. Le esperienze sono utili per introdurre lo studio della microbiologia e per facilitare la comprensione di temi importanti, quali la moltiplicazione mediante fissione binaria, l'uso dei terreni di coltura, la quantificazione dei batteri di un campione. La scelta di coltivare microrganismi da elementi che sono parte dell'esperienza quotidiana stimola l'interesse degli studenti ed elimina la necessità di conservare ceppi batterici in laboratorio.

PAROLE CHIAVE

SCUOLA SECONDARIA DI SECONDO GRADO / SECONDARY SCHOOL - HIGH SCHOOL; SCIENZE / SCIENCE; BIOLOGIA / BIOLOGY; MICROBIOLOGIA / MICROBIOLOGY; BATTERIOLOGIA / BACTERIOLOGY; DIDATTICA DELLE SCIENZE / SCIENCE EDUCATION; DIDATTICA DELLA MICROBIOLOGIA / MICROBIOLOGY EDUCATION; DIDATTICA DI LABORATORIO / TEACHING LABORATORY.

1. MOTIVAZIONI

La *batteriologia* è una disciplina di importanza centrale. Purtroppo, il suo studio può risultare poco attraente, perché tratta di organismi non visibili, al di fuori dell'esperienza diretta degli studenti, e per di più percepiti come nocivi nel loro insieme. Questo lavoro propone due semplici *esperienze di laboratorio*, che, insieme o separatamente, possono accompagnare le lezioni di microbiologia, stimolando l'interesse degli studenti e favorendo la comprensione di alcuni aspetti fondamentali

* Docente referente del PAS A057 dell'Università di Trieste.

della *biologia dei batteri*.

2. DESCRIZIONE GENERALE DELLE ESPERIENZE ED OBIETTIVI PERSEGUITI

La prima esperienza consiste nel coltivare i batteri presenti sulle superfici corporee e su piccoli oggetti di proprietà degli studenti; la seconda riguarda la quantificazione di batteri presenti in derivati del latte (bevande probiotiche).

Le due esperienze condividono questi *obiettivi* formativi generali:

- Rendere consapevoli della *costante e ingente* presenza di microrganismi nell'ambiente in cui viviamo e in associazione alla nostra persona;
- Favorire la comprensione della *diversità microbica* e dell'esistenza di *specie utili* accanto a quelle potenzialmente *patogene*;
- Favorire la comprensione della *moltiplicazione batterica* (scissione binaria);
- Favorire la comprensione di alcune *metodologie* di base della microbiologia, come la *coltura* e i *metodi di conta*.

Le due esperienze hanno un grado di complessità crescente per quanto riguarda la *strumentazione* impiegata e l'esecuzione e si possono realizzare nell'ambito di un'unica sessione o separatamente. In questo lavoro verranno fornite delle informazioni dettagliate su come organizzarle e delle proposte di discussione, che ciascun docente potrà utilizzare, armonizzandole alle esigenze dei propri progetti didattici.

Una caratteristica fondamentale di entrambe le esperienze è che esse consentono di evidenziare la presenza di microrganismi normalmente presenti nelle situazioni o attività quotidiane, fatto questo che, da un lato, stimola l'interesse e, dall'altro, consente di evitare l'uso di ceppi batterici conservati in laboratorio.

3. PRIMA ESPERIENZA: LA CRESCITA IN COLTURA RIVELA LA PRESENZA DI MICRORGANISMI SULLE MANI DEGLI STUDENTI E SU OGGETTI DI USO COMUNE

3.1 INTRODUZIONE

Questa esperienza è forse la più semplice che si possa organizzare e non è certo originale. Mi permetto di riportarla all'attenzione dei docenti, perché, per quella che è

la mia esperienza, può dare dei risultati veramente straordinari con pochissimo materiale e anche in assenza di un laboratorio adeguatamente attrezzato.

L'unico materiale richiesto, infatti, consiste in un certo numero di *piastre di Petri*¹ contenenti del *terreno di coltura*. L'obiettivo pratico dell'esperienza è quello di far crescere nelle piastre i microrganismi presenti sulle mani degli studenti e su altri oggetti presenti in classe o di proprietà degli alunni.

3.2 MATERIALE NECESSARIO

Alcune piastre contenenti terreno di coltura. Consiglio di prepararne almeno una ogni due-tre studenti; meglio ancora se si riesce a farne una per ciascuno studente.

Può essere utilizzato qualsiasi terreno che sostenga la crescita di un'ampia varietà di microrganismi, come l'*Agar Nutriente* oppure il *Plate Count Agar*. È possibile utilizzare anche *Milk Plate Count Agar* (MPCA), che è indicato per la seconda esperienza, a seconda della disponibilità (v. Scheda 1, in appendice).

3.3 AMBIENTE EDUCATIVO

Si può eseguire in Laboratorio (di Scienze / di Biologia) o in classe. Nel primo caso gli studenti possono partecipare anche alla preparazione e alla distribuzione del terreno nelle piastre.

3.4 TEMPISTICA

1 ora per la preparazione delle piastre (può essere fatta dal docente da solo).

10 minuti per l'esecuzione in classe.

1 giorno d'incubazione in termostato a 37 °C oppure 3-4 giorni di incubazione a temperatura ambiente.

10 minuti per visualizzare i risultati + il tempo per la discussione (variabile).

¹ Si tratta di recipienti piatti, di forma cilindrica, usati in Microbiologia come contenitori per terreni di coltura solidi o semi-solidi. Originariamente di vetro, le piastre di Petri vengono oggi realizzate prevalentemente in materiale plastico e sono vendute già sterili. In esse viene versato il terreno di coltura sterilizzato a parte e mantenuto alla temperatura di 50-55 °C, in modo da conservare lo stato liquido. Una volta versato nella piastra di Petri, il terreno si raffredderà e, grazie all'agar in esso contenuto, solidificherà. Piastre di Petri contenenti terreno di coltura sono visibili nelle Figure 1, 3 e 4.

3.5 ESECUZIONE DELL'ESPERIENZA

Il docente porta le piastre in laboratorio o in classe e chiede agli studenti di appoggiare delicatamente le dita, alcuni capelli, o dei piccoli oggetti sulla superficie delle piastre (anelli, ciondoli, chiavi, cellulari).

Capita spesso che gli studenti vogliano provare ad appoggiare le dita prima e dopo essersi lavati le mani: suggerisco di lasciarli fare, ma di raccomandare loro di lavarsi scrupolosamente, con acqua e sapone, e di asciugarsi con un fazzolettino di carta pulito, altrimenti la differenza si vedrà poco. Gli studenti devono scrivere il proprio nome *sul fondo* della piastra che hanno manipolato (mai scrivere sul coperchio), in modo da riconoscerla in seguito.

Una volta *inoculate*, le piastre devono essere *incubate* per permettere la moltiplicazione batterica. Questo può essere fatto per una notte a 37 °C, se si dispone di un termostato, oppure a temperatura ambiente per 4-5 giorni. Le piastre vanno tenute sempre capovolte (con il coperchio in basso), per evitare la formazione di condensa. Consiglio di non ispezionare le piastre con gli studenti appena le colonie si rendono visibili, ma di attendere ulteriori 2-3 giorni, in modo che esse sviluppino bene la pigmentazione.

Nonostante le colture contengano probabilmente solo *microrganismi commensali* o *ambientali*², è bene imporre di non aprire le piastre per l'ispezione. Eventualmente il docente può decidere di chiuderle con del nastro adesivo per evitare che questo accada. Le piastre di Petri contenenti le colture devono essere smaltite come specificato nella Scheda 1.

3.6 RISULTATI E LORO INTERPRETAZIONE

Normalmente, dopo l'incubazione, le piastre presentano numerose colonie batteriche cresciute sulla superficie del terreno. Queste possono avere morfologia e colore variabili (v. Figura 1). Il *numero delle colonie* rispecchia la quantità di batteri presenti sul campione analizzato. Infatti, quando gli oggetti o le dita vengono appoggiati sul

² Si tratta di microrganismi normalmente presenti sulle superfici corporee o nell'ambiente, che non causano malattia negli individui dotati di sistemi di difesa integri. Per approfondimenti vedi: DEHÒ, GALLI 2014.

terreno, vi rilasciano i microrganismi presenti alla loro superficie.

Ogni cellula batterica depositata si moltiplicherà grazie agli elementi nutritivi presenti nel terreno e, dopo un adeguato lasso di tempo, darà origine a una progenie abbastanza numerosa, da formare un cumulo visibile ad occhio nudo, cioè a una *colonia*. Quindi, in ogni punto dove era stato depositato un batterio crescerà una colonia.

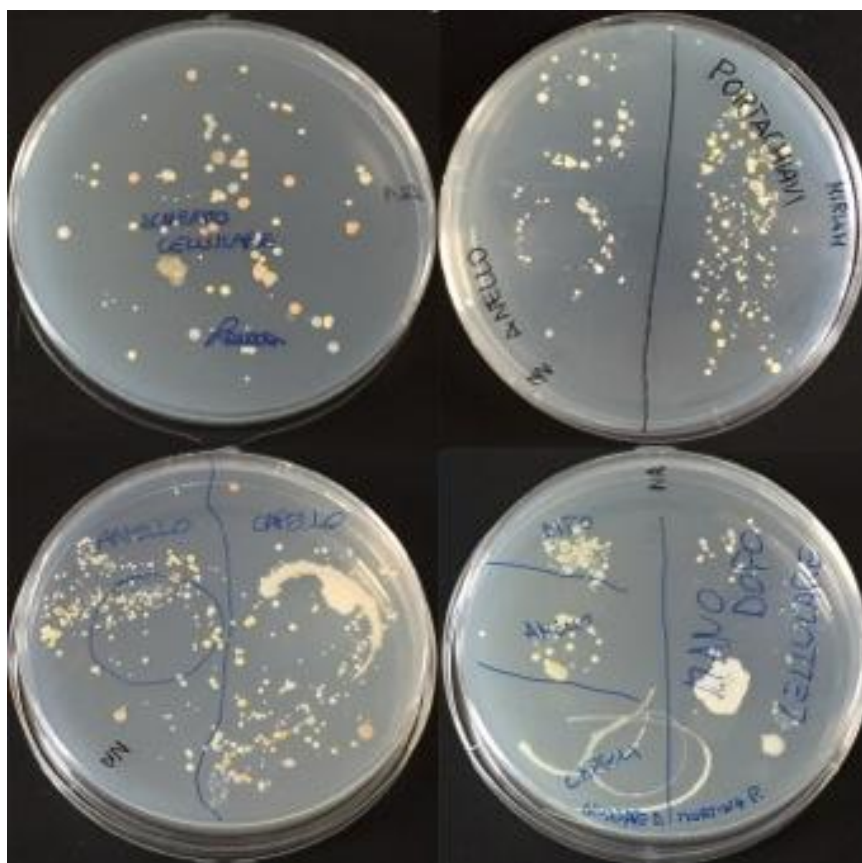


Figura 1. Esempi di colture ottenute dagli studenti.

Su questo principio³ si basa il *metodo di conta batterica* detto delle “conte vitali”. Contando le colonie, gli studenti possono capire quanti batteri erano presenti sulle mani o sugli oggetti analizzati. Inoltre, la varietà di *colori* e *forme* delle colonie osservate rispecchia la varietà di specie batteriche presenti.

Questa semplice esperienza consente agli studenti di avere un contatto diretto con i

³ Anche se può risultare poco rilevante ai fini di questa trattazione, è bene segnalare che il principio enunciato può avere delle eccezioni: è possibile, ad esempio, che da due o più batteri aggregati origini una sola colonia apprezzabile visivamente.

microrganismi che loro stessi albergano. Questo ha un notevole impatto emotivo, stimola la curiosità e favorisce l'attenzione.

3.7 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Questa esperienza si presta a diversi approfondimenti. Questi sono gli spunti di discussione che suggerisco:

Il metodo di coltura in piastra e l'utilizzo dell'agar per solidificare i terreni

Normalmente, le tecniche colturali impongono di lavorare in sterilità, per evitare di contaminare le colture (v. Scheda 1). Questa esperienza costituisce un'occasione per fare ciò che normalmente è proibito, ovvero toccare la superficie del terreno con le dita. Il contatto consente di percepire l'umidità superficiale del terreno, una caratteristica legata all'utilizzo dell'agar come solidificante. L'agar, oltre a produrre un ambiente con umidità ottimale, viene difficilmente degradato dai batteri, mantenendo le proprie caratteristiche. L'utilizzo di terreni solidi, in contrapposizione a quelli liquidi, consente di apprezzare la morfologia delle colonie (dimensioni, margini, lucentezza, colore) e di contare i batteri che le formano.

La moltiplicazione mediante scissione binaria

Una colonia è formata - almeno in prima approssimazione - da una singola cellula batterica deposta sulla superficie del terreno solido. Questo è possibile per il fatto che ogni cellula si divide dando origine a due cellule figlie, senza bisogno di interagire con altre (*scissione binaria*).

Le dimensioni batteriche e la velocità di replicazione.

È possibile far ragionare gli studenti sulle dimensioni dei batteri rispetto a quelle della colonia, in modo da calcolare quanti batteri possono essere approssimativamente necessari perché questa diventi visibile a occhio nudo (circa 10^8 - 10^9). Questo dà un'idea di quanto numerose siano le popolazioni batteriche e di quanto rapidamente avvenga la moltiplicazione. Per fare i calcoli, si può considerare una grandezza media di $1 \mu\text{m}^3$ per cellula batterica e di 1mm^3 per una colonia.

La presenza dei batteri nel mondo circostante è costante e praticamente inevitabile.

L'esperienza dimostra che i batteri sono presenti ovunque, in quantità misurabile. Inoltre, i batteri che sono stati coltivati non sono pericolosi per un individuo sano (erano sulle mani e sugli oggetti quotidianamente manipolati e nessuno si è ammalato per questo), almeno finché rimangono in quantità controllabili e le nostre barriere (in questo caso la cute) sono integre.

Non tutti i batteri sono patogeni, anzi: delle 10^{12} specie batteriche che si ritiene esistano, meno di duecento sono, con diversa frequenza, causa di malattia nell'uomo⁴. Le rimanenti vivono nel mondo attorno a noi e insieme a noi, costituendo un insieme di organismi dagli stili di vita quanto mai vari ed affascinanti (un utile esercizio potrebbe essere scoprirne alcuni⁵). È rilevante anche ricordare che la presenza di determinati batteri in alcuni distretti del nostro organismo è di importanza fondamentale per la nostra salute (v. § 4.7).

4. SECONDA ESPERIENZA: I PROBIOTICI POSSONO DAVVERO CONTENERE “PIÙ DI 6 MILIARDI DI CELLULE VIVE”, COME PUBBLICIZZATO IN TELEVISIONE?

4.1 INTRODUZIONE

Questa esperienza vuole stimolare la curiosità degli studenti attraverso la presentazione di un alimento che contiene batteri vivi e con potenziali effetti benefici. Sicuramente la maggior parte dei ragazzi ricorderà di aver visto la pubblicità in televisione, ma quanti di loro sanno che i *fermenti lattici* sono batteri, così come lo sono quegli organismi che, in altri spot, vengono presentati nella forma di cattivissimi mostriciattoli, da sterminare con opportuni prodotti disinfettanti? Che differenze ci sono? E perché la pubblicità si vanta del loro numero?

⁴ V. in Siti web il *Decreto legislativo n. 81/08. Allegato XLVI. Elenco degli agenti biologici classificati.*

⁵ A seconda delle specie, i batteri sono in grado di vivere in ambienti con caratteristiche molto diverse e persino estreme: da pH= 1 (sorgenti calde e acide) fino a pH>11 (laghi alcalini); da temperature bassissime (ghiacci antartici) fino a temperature >100 °C (sorgenti idrotermali sottomarine, geiser); da acque prive di soluti (recipienti di acqua distillata) fino a soluzioni praticamente sature (saline); dai deserti soleggiati alle buie profondità anaerobiche del fondo degli stagni. Sono inoltre in grado di fare cose sorprendenti, come orientarsi nel campo magnetico terrestre o produrre appendici che trasportano gli elettroni come dei cavi elettrici. Consiglio, oltre al già citato testo di DEHÒ, GALLI (2014), il blog del prof. emerito Moselio Schaechter, ospitato presso il sito dell'*American Society for Microbiology* (in Inglese), costantemente aggiornato con novità e curiosità sulla vita microbica: <<http://schaechter.asmblog.org/schaechter/>>.

Praticamente, l'esperienza consiste nel contare i batteri presenti in una confezione di *probiotico* (volendo, si possono confrontare probiotici di più marche diverse). Il principio è lo stesso già enunciato per la coltura dei batteri presenti sulle mani, ma in questo caso l'esperienza sarà eseguita in forma tecnicamente più rigorosa. La sua esecuzione richiede pertanto la disponibilità di un Laboratorio (di Scienze / Biologia adeguatamente attrezzato) e di alcuni materiali/strumenti specifici.

4.2 MATERIALE NECESSARIO

- Sei piastre contenenti terreno MPCA o simile per ogni conta (v. Scheda 1);
- Pipette automatiche e puntali sterili;
- Provette contenenti 9,9 ml di soluzione fisiologica sterile;
- Spatole sterili;
- Una o più confezioni di probiotici acquistati in supermercato (se ne possono usare di marchi diversi, più o meno vicini alla data di scadenza o addirittura già scaduti);
- Incubatore a 37 °C (non strettamente necessario, v. § 4.5)

4.3 AMBIENTE EDUCATIVO

L'esperienza va eseguita in laboratorio. Gli studenti possono partecipare anche alla preparazione e alla distribuzione del terreno nelle piastre.

4.4 TEMPISTICA

1 ora per la preparazione delle piastre (considerare però che l'interazione di più persone in classe porta via del tempo).

40 minuti per l'esecuzione in classe.

2 giorni d'incubazione in termostato o 4-5 giorni di incubazione a temperatura ambiente.

15 minuti per visualizzare i risultati + il tempo per la discussione (variabile).

4.5 ESECUZIONE

Poiché i probiotici contengono un'alta concentrazione di batteri, è necessario procedere alla loro diluizione prima di dispensarne delle aliquote nelle piastre di coltura. Per eseguire tre diluizioni seriali (ciascuna 1:100) del probiotico, procedere così: per eseguire la prima diluizione, trasferire sterilmente 0,1 ml di probiotico in 9,9 ml di soluzione fisiologica sterile.

Il liquido può essere trasferito con una pipetta automatica dotata di puntali sterili, (0,1 ml=100 µl, quindi usare una pipetta adeguata a trasferire questo volume). Agitare bene, quindi prelevare 100 µl della prima diluizione e trasferirli nella seconda provetta di soluzione fisiologica (si ottiene una diluizione 1:100 della diluizione 1:100, ovvero una diluizione 1:10000 o 10^{-4} del probiotico).

Agitare bene l'ultima diluizione (10^{-4}), quindi prelevarne 100 µl e trasferirli nella terza provetta di soluzione fisiologica (si ottiene una diluizione 10^{-6} del probiotico) (vedi schema in Figura 2).

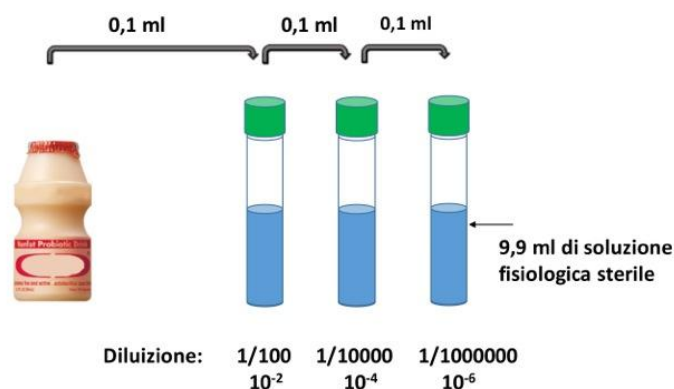


Figura 2. Rappresentazione schematica delle diluizioni seriali.

Ricordarsi di **AGITARE BENE** le provette a ogni passaggio e di marcarle prima di cominciare, per non confonderle.

Di ciascuna diluizione (10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6}) piastrare 0.1 ml su due delle piastre di MPCA (6 piastre da inoculare in totale).

Per ogni singola piastra da seminare comportarsi così: depositare con la pipetta 100 µl

di sospensione batterica alla diluizione prescelta sulla superficie del terreno. Aiutandosi con una spatola sterile, distribuire la sospensione su tutta la superficie del terreno, in modo da farla penetrare (v. Figura 3).



Figura 3. Distribuzione del campione sulla superficie del terreno per mezzo di una spatola sterile, che in questo caso è stata ricavata piegando alla fiamma una pipetta Pasteur.

Continuare a spatolare fino a quando non si vedrà più del liquido sulla superficie del terreno. Incubare le piastre capovolte in termostato a 37 °C per 2 giorni (oppure a temperatura ambiente finché non si svilupperanno le colonie - in media 4-5 giorni).

4.6 RISULTATI E LORO INTERPRETAZIONE

Trascorso il periodo d'incubazione, gli studenti osserveranno le colonie cresciute su tutte le piastre, e dovranno individuare la diluizione migliore per contare le *Unità Formanti Colonia* (UFC). In effetti, le colonie si contano bene quando il loro numero è compreso circa tra 20 e 400 per piastra. Per quanto riguarda i probiotici, la diluizione migliore è di solito 10^{-6} (v. Figura 4). Per evitare di fare confusione, è possibile spuntare le colonie man mano che si contano, scrivendo con un pennarello sul fondo della piastra. I risultati delle due piastre della stessa diluizione vanno registrati e mediati. Colonie di forma, colore e dimensioni diverse dalla maggioranza devono essere considerate come derivanti da *contaminazione* (v. Figura 5) ed escluse dalla conta.

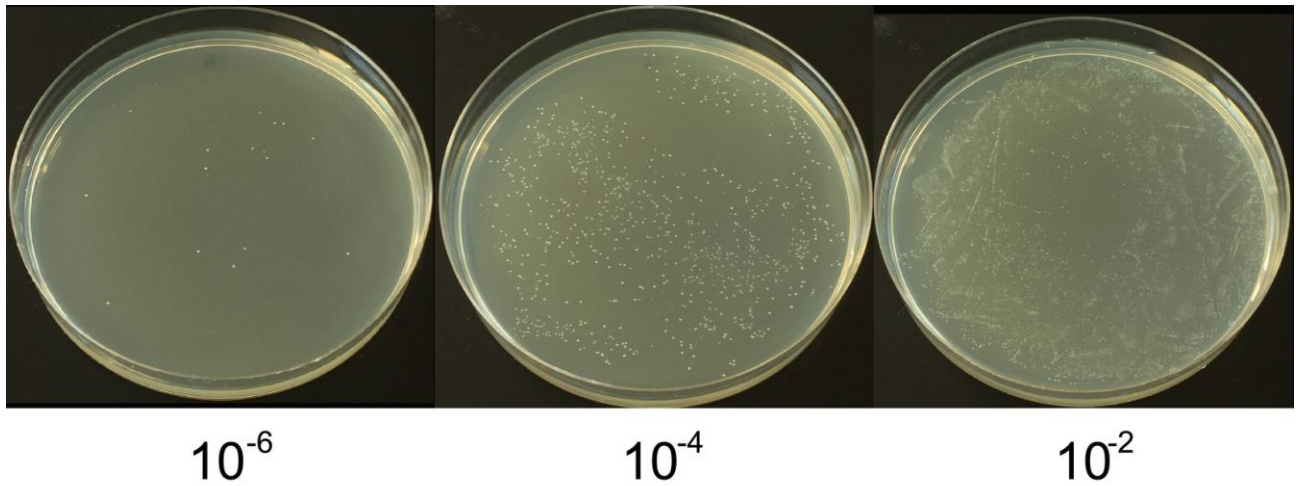


Figura 4. Seconda esperienza: risultato delle conte. Le piastre contabili sono quelle contenenti la diluizione 10⁻⁶, mentre nelle piastre contenenti le diluizioni 10⁻² e 10⁻⁴ si è sviluppato un numero eccessivo di colonie. Si noti, inoltre, l'omogeneità di aspetto delle colonie.

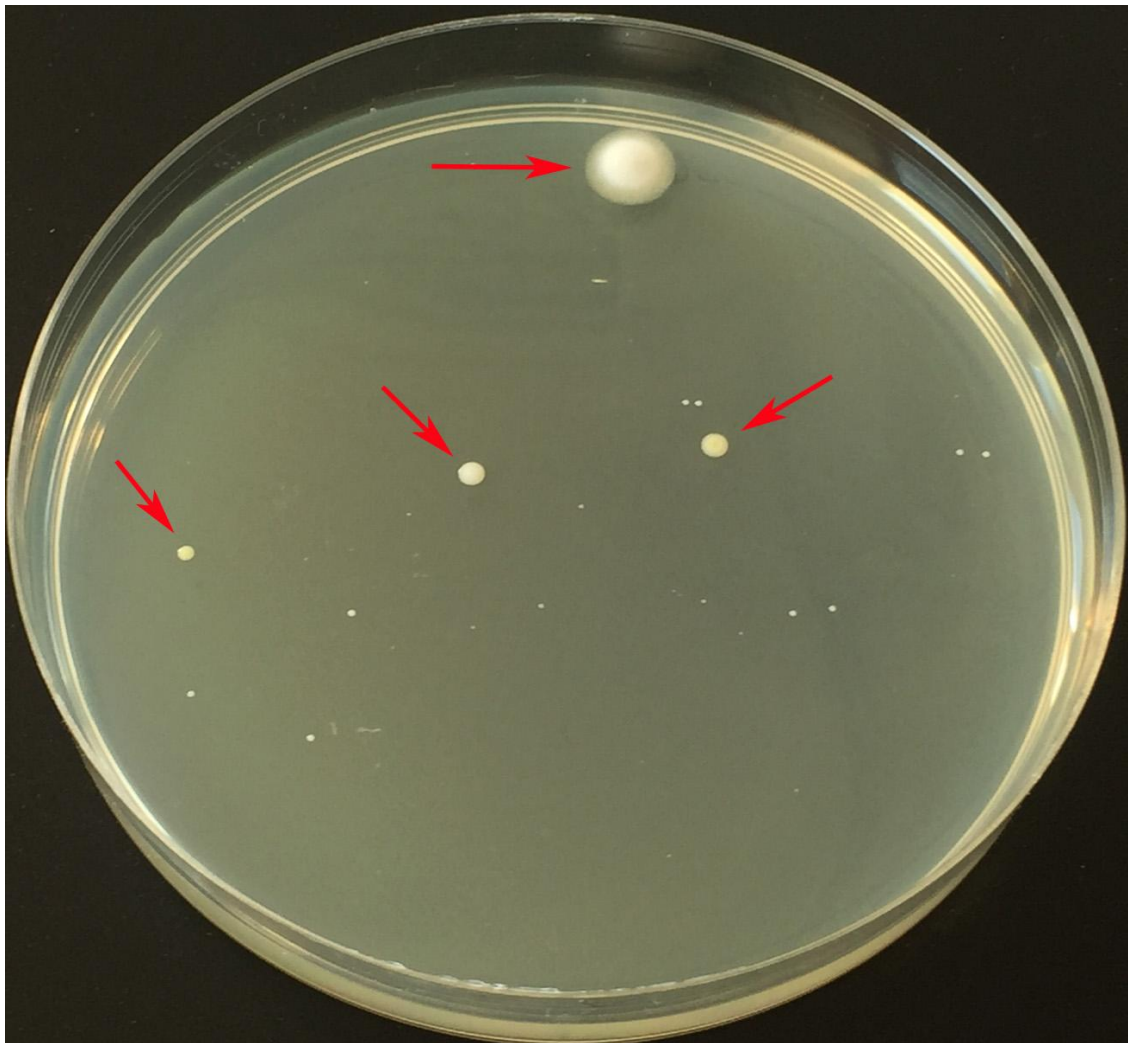


Figura 5. Esempio di coltura contaminata: le colonie indicate da frecce derivano dalla crescita di microrganismi diversi dai lattobacilli. In particolare, la colonia più in alto è stata formata da una muffa.

Dopo aver contato le colonie, gli studenti dovranno calcolare il numero di *Unità Formanti Colonia* (UFC) per millilitro di probiotico, applicando la seguente formula:

UFC/ml= numero medio di colonie per piastra x 10 x fattore di diluizione

Esempio:
ipotizzando di aver contato 123 e 135 colonie nelle due piastre della diluizione 10^{-6} ,
il calcolo da fare è questo:

$$(123+135):2 \times 10 \times 10^6 = 129 \times 10^7 = 1,29 \times 10^9 \text{ UFC/ml di probiotico}$$

Media delle due piastre Sono stati piastrati 0,1 ml È stata contata la diluizione 10^{-6}

Infine, il numero di UFC nell'intera dose di probiotico va calcolata nel seguente modo:

$$\text{UFC totali (dose giornaliera)} = \text{UFC/ml} \times \text{volume di probiotico espresso in ml}$$

4.7 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Anche se gli effetti dei diversi tipi di fermenti non sono stati ben definiti, si ritiene che i probiotici favoriscano l'equilibrio della *flora intestinale*, se assunti secondo le modalità e nelle quantità indicate dalle *Linee guida* del Ministero della Salute⁶. Queste ultime stabiliscono che la dose giornaliera deve contenere, fino alla data di scadenza riportata sulla confezione, almeno 1 miliardo di cellule vive di almeno uno dei ceppi presenti.

Per quella che è la mia esperienza, i probiotici in commercio rispettano ampiamente le normative ministeriali, cosicché il numero di UFC totali riscontrate è di solito superiore a quanto previsto, fino ed anche oltre la scadenza indicata sulla confezione. Al di là delle ovvie trattazioni tecniche riguardanti la coltura e l'esecuzione delle conte vitali, questa esperienza si presta a discutere, tra gli altri, i seguenti argomenti.

⁶ Si veda in proposito: <http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf>.

L'uso di batteri nella preparazione degli alimenti

Alcune specie di batteri vengono impiegate per la produzione di alimenti, come bevande probiotiche, yogurth, formaggi (es. *Emmentaler*), crauti, kefir, ecc. È possibile scoprirne altri, evitando però di fare confusione con gli alimenti prodotti da *lieviti*.

Il microbiota umano e la sua importanza

I batteri che vivono a noi associati (sulle superfici corporee o all'interno) sopravanzano numericamente le nostre stesse cellule di 1,3-10 volte⁷ ed hanno un forte impatto sulla nostra fisiologia, fornendo funzioni che noi non possediamo.

In particolare, il *microbiota intestinale* è un eccezionale *ecosistema complesso*, costituito da una moltitudine di specie batteriche. Un microbiota intestinale equilibrato svolge molte azioni positive, tra le quali ricordiamo⁸:

- la maturazione e la modulazione del sistema immunitario;
- l'utilizzo di nutrienti che altrimenti sarebbero inaccessibili;
- l'inibizione della proliferazione di batteri nocivi;
- la promozione del transito intestinale;
- la sintesi di vitamine (come la vitamina K e la vitamina B12) e di alcuni aminoacidi.

5. POSSIBILI VARIANTI DELLE ESPERIENZE PROPOSTE

Nel realizzare le esperienze, i docenti potranno lavorare di fantasia e provare delle varianti. Ne suggerisco qualcuna:

- il *terreno PCA* si presta a far crescere batteri e altri microrganismi, in particolare funghi, da alimenti (ad es. latte non pastorizzato, yogurt, kefir, crauti non cotti, alimenti andati a male), acqua di stagno, terriccio, placca dentale, spugnette per lavare le stoviglie, ecc.;
- le *conte vitali* possono essere eseguite anche in modo meno rigoroso, utilizzando

⁷ TURNBAUGH et alii 2007; SENDER et alii 2016.

⁸ TURNBAUGH et alii 2007.

dei contagocce sterili al posto delle pipette automatiche per il trasferimento dei volumi di liquido (una goccia corrisponde a 50 µl circa);

- se ci si limita a discutere l'esistenza di forme viventi semplici e piccolissime, la prima esperienza è accessibile perfino ad alunni della Scuola primaria.

6. CONCLUSIONI

Le due esperienze proposte possono venire utilizzate per introdurre o accompagnare lo studio della microbiologia a diversi livelli. Nella forma più semplice, possono venire utilizzate per stimolare la curiosità verso il mondo microbico e per aiutare lo studente a collocare la presenza, la numerosità e il ruolo dei batteri in una prospettiva corretta. Ad un livello più complesso, possono fornire un utile supporto alla comprensione di importanti aspetti biologici e tecnici, quali la fissione binaria, la crescita in coltura, la conta dei batteri presenti in un campione, le dimensioni delle popolazioni batteriche.

BIBLIOGRAFIA

DEHÒ G., GALLI E.

2014, *Biologia dei Microrganismi*, Milano, Casa Editrice Ambrosiana.

SENDER R., FUCHS S., MILO R.

2016, *Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body*, «PLOS Biol.», 14(8):e1002533, scaricabile dal sito web: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>>.

TURNBAUGH P. J., LEY R. E., HAMADY M., FRASER-LIGGETT C., KNIGHT R., GORDON J. I.

2007, *The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world*, «Nature», 449 (7164), pp. 804–810, scaricabile dal sito web: <<http://doi.org/10.1038/nature06244>>.

SITI WEB

Blog del Prof. emerito Moselio Schaechter,

<<http://schaechter.asmblog.org/schaechter/>>, sito consultato il 9/1/2017.

Decreto legislativo n. 81/08. Allegato XLVI. Elenco degli agenti biologici classificati,

<<http://www.bio.unipd.it/safety/man/allegato2.html>>, sito consultato il 9/1/2017.

MINISTERO DELLA SALUTE - DGSAN DIPARTIMENTO SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA, SICUREZZA ALIMENTARE E ORGANI COLLEGIALI PER LA TUTELA DELLA SALUTE - DIREZIONE GENERALE IGIENE E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E DELLA NUTRIZIONE - UFFICIO IV EX DGSAN

Linee guida su probiotici e prebiotici - Revisione Maggio 2013,

<http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf>, sito consultato il 9/1/2017.

APPENDICE

Scheda 1. Preparazione delle piastre di coltura e lavoro in sterilità

Materiale necessario

- bottiglie pirex (attenzione alle dimensioni: devono poter entrare nel dispositivo che useremo per la sterilizzazione, ad es. nella pentola a pressione);
- terreno liofilizzato. Per la prima esperienza va bene un qualsiasi terreno generico, come *Nutrient Agar* (NA) o *Plate Count Agar* (PCA). Per la seconda, consiglio *Milk Plate Count Agar* (MPCA), che si può trovare già pronto oppure fare in casa, aggiungendo latte magro in polvere (1 g per litro) al PCA (oppure al NA, se si dispone di quest'ultimo);
- acqua distillata (va bene quella del ferro da stiro);
- bilancia (va bene una bilancia digitale da cucina);
- misurino per l'acqua (cilindro o misurino casalingo, non è necessaria una grande precisione);
- autoclave o pentola a pressione (va bene quella di casa).
- piastre di Petri in plastica, sterili.

Preparazione

- pesare la quantità di polvere adatta al volume di terreno che si vuole preparare (sul barattolo del terreno sono sempre presenti le istruzioni per la reidratazione);
- porre la polvere nella bottiglia pirex ed aggiungere l'acqua distillata;
- agitare (il terreno contiene agar, che non si scioglie a temperatura ambiente, quindi l'aspetto rimane torbido);
- svitare di mezzo giro il tappo della bottiglia per far circolare il vapore durante la sterilizzazione;
- sterilizzare in autoclave (classico ciclo di 15 minuti a 121 °C) oppure in pentola a pressione. In quest'ultimo caso procedere così: mettere un dito di acqua sul fondo della pentola, quindi mettere la bottiglia nel cestello per la cucina a vapore (se disponibile) oppure sul fondo della pentola, adagiato su uno straccio (v. Figura 6). Mantenere sul fuoco per 30 minuti a partire dal "fischio".



Figura 6. Disposizione delle bottiglie Pirex per la sterilizzazione.

- Terminato il processo di sterilizzazione, lasciar raffreddare un po' prima di aprire l'autoclave o la pentola a pressione (il vapore è ustionante), quindi estrarre la bottiglia di terreno e chiudere subito bene il tappo. A questo punto agitare per distribuire bene l'agar, che si sarà sciolto, ma sarà più concentrato sul fondo. Questa operazione va fatta con molta attenzione, perché il terreno che eventualmente esce dalla bottiglia può causare gravi ustioni.
- Quando il terreno è un po' raffreddato (circa 50-55 °C), può essere versato nelle piastre. Lo si può fare direttamente dalla bottiglia, oppure con una pipetta sterile. Attenzione a tenere aperte le piastre il minimo indispensabile, altrimenti si possono inquinare. Bisogna versare circa 20-25 ml di terreno per piastra da 10 cm di diametro (non serve essere precisi, l'importante è che il fondo della piastra sia ben coperto). Lasciar solidificare il terreno e quindi conservare le piastre capovolte fino al momento dell'uso.

NOTA: Il terreno sterilizzato può essere conservato in bottiglia, con il tappo ben chiuso, e versato in piastra successivamente. In questo caso l'agar, raffreddandosi, pur rimanendo sterile, ri-

solidifica. Prima di versare il terreno nelle piastre bisognerà quindi fonderlo nuovamente a bagnomaria o in forno a microonde.

Naturalmente, è possibile acquistare i terreni di coltura già dispensati in piastre pronte per l'uso. È una soluzione comoda, che permette di evitare la preparazione, ma più costosa. Inoltre, il terreno in piastra ha una durata molto limitata, mentre quello liofilizzato si conserva bene per molti anni.

Il lavoro in sterilità

La preparazione del terreno di coltura e le esperienze andrebbero condotte lavorando “in sterilità”, per evitare di contaminare le colture con microrganismi ambientali o rilasciati dall'operatore. È possibile ottenere buoni risultati seguendo delle semplici regole:

- Tenere aperti i recipienti contenenti materiale sterile (bottiglie, piastre di Petri e provette di soluzione fisiologica) per il minor tempo possibile;
- Non appoggiare strumenti sterili sul piano da lavoro (che non è sterile), ma, eventualmente, in piastre di Petri vuote;
- Evitare di parlare/respirare vicino alle colture;
- Lavarsi le mani prima di lavorare;
- Evitare di lavorare in mezzo a correnti d'aria.

Smaltimento delle colture

Le piastre di Petri contenenti le colture non possono essere gettate nei rifiuti urbani. Per smaltirle, consiglio di chiuderle in appositi sacchi da autoclave e di sterilizzarle in autoclave o in pentola a pressione, come già fatto per la preparazione del terreno.

I sacchetti da autoclave resistono alla temperatura di sterilizzazione senza rompersi: saranno quindi in grado di trattenere sia la plastica delle piastre di Petri che il terreno quando, a causa del trattamento al calore, fonderanno. Il sacchetto contenente la massa fusa verrà poi lasciato raffreddare, e quindi solidificare, prima di essere gettato nei rifiuti.

I sacchetti da autoclave sono disponibili in varie dimensioni e vengono solitamente venduti dagli stessi fornitori che commerciano le piastre di Petri.