



Microbi e molecole

MODULO

1

European Initiative for Biotechnology Education

Gruppo di lavoro

Eckhard R. Lucius (Coordinatore del modulo)

Catherine Adley, Jan Frings, Cecily Leonard, Dean Madden, Marcus Müller, Uta Nellen, Patricia Nevers, John Schollar, Marleen van Strydonck, Paul Wymer.



L'Iniziativa Europea per l'Educazione alla Biotecnologia (EIBE) ha per vocazione il miglioramento della comprensione della biotecnologia, di promuovere le sue tecniche, e di stimolare il dibattito pubblico con una formazione adeguata nelle scuole e nelle università dell'Unione Europea (UE).

Corrispondenti dell'EIBE



AUSTRIA

| Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-1170 WIEN.



BELGIO

| Vic Damen / Marleen Van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didactiek en Kritiek, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.



DANIMARCA

| Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sønderengen 20, DK-2860 SØBORG.
| Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.



EIRE

| Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, LIMERICK.



FRANCIA

| Gérard Coutouly, LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.
| Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boite Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



GERMANIA

| Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Regina Rojek / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL.
| Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.
| Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behagel-Straße 10, D-35394 GIEßEN.



LUSSEMBURGO

| John Watson, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.



ITALIA

| Antonio Bargellesi-Severi / Alessandra Corda Mannino / Stefania Uccelli, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.



OLANDA

| David Bennett, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.
| Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Academy for Communication, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.
| Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotecnologie, FEO, Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT.



REGNO UNITO

| Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.
| John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.
| Jill Turner, School of Nursing and Midwifery, 1-3 College Park East, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1LQ
| Paul Wymer, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, READING, RG7 1AE.



SPAGNA

| María Sáez Brezmes / Angela Gómez-Niño / Rosa M. Villamañán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



SVEZIA

| Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV.

Coordinatore dell'EIBE

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL, Germany. Telephone: + 49 (0) 431 880 3166 (EIBE Secretary: Regina Rojek). Facsimile: + 49 (0) 431 880 3132.



Contenuti



Avvertenze, diritti d'autore e ringraziamenti	4
Notizie sul modulo n°1	
Introduzione	5
Realizzazione di modelli	
Modello di DNA	6
Modello di microorganismi	8
Estrazione di DNA	
Estrazione di DNA da batteri	10
Estrazione di DNA dalla cipolla	12
Prodotti di microorganismi	
Produzione di amilasi	14
Produzione di cellulasi	16
Produzione di antibiotico	18
Osservazione dell'attività microbica	
Panificazione	20
Cellule di lievito immobilizzato	22
Pila a combustibile microbico	25
Trasferimento genetico	
Coniugazione batterica	27
Trasferimento genetico utilizzando <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
Appendice 1	
Terreni per colture batteriche	34
Appendice 2	
Tecniche microbiologiche di base	35
Appendice 3	
Apertura di un'ampolla	39

World Wide Web



Pochi settori conoscono uno sviluppo così rapido come la biotecnologia. La pubblicazione elettronica dei moduli dell'EIBE permette una revisione ed un aggiornamento continuo dei contenuti e una diffusione ad un costo ridotto.

Questo e gli altri moduli dell'EIBE sono disponibili in tutto il mondo sul WWW:
<http://www.eibe.rdg.ac.uk:8001/>

Tutti i moduli sono documenti in formato PDF, ciò significa che le illustrazioni di alta qualità, i colori, i caratteri tipografici e l'impaginazione di questi documenti verranno conservati qualunque Computer voi abbiate (Macintosh, compreso il Power PC, Windows, Dos e Unix).

I documenti in formato PDF sono anche di dimensione minore rispetto agli originali dai quali sono stati creati e, pertanto, occorrerà meno tempo per trasferire i documenti. Fate attenzione che per visualizzare i moduli dell'EIBE avrete bisogno di una copia del software Adobe Acrobat Reader.

Il software Adobe Acrobat Reader 2.01 è disponibile gratuitamente in diverse lingue (tedesco, inglese, spagnolo, francese, italiano, olandese e svedese). Può essere recuperato a partire dal sito:

<http://www.adobe.com/>

Con questo software puoi visualizzare e stampare i moduli dell'EIBE e navigare facilmente attraverso i documenti. N.B.: Adobe Acrobat sono i marchi depositati di Adobe System Incorporated. Macintosh è il marchio depositato dell'Apple Computer Incorporated.

Avvertenze

In tutti i moduli EIBE abbiamo posto attenzione nell'individuare tutto ciò che può rappresentare un pericolo ed abbiamo suggerito le precauzioni più idonee.

Dove è possibile, le metodologie proposte rientrano nei parametri di rischio delle valutazioni generali comunemente adottate. Se sussiste una speciale situazione di rischio, essa è stata indicata.

L'appendice 2 di questo modulo riporta linee di sicurezza aggiuntive.

Inoltre, coloro che usano queste tecniche devono tenere conto che possono esserci degli errori o delle omissioni e che ogni operatore o insegnante segue differenti standard di sicurezza. In particolare operatori ed insegnanti devono attenersi alle norme locali vigenti, indipendentemente da ciò che suggerisce il modulo EIBE.

A meno che il contesto indichi altrimenti, si presume che:

- l'attività venga svolta in un laboratorio (scientifico) adeguatamente attrezzato e sicuro;
- si utilizzino gli strumenti correttamente ed in sicurezza;
- si faccia attenzione alle normali operazioni di laboratorio, come per esempio scaldare sostanze;
- si svolga l'attività in un laboratorio adeguatamente attrezzato, quando si manipolano sostanze chimiche o organismi vivi;
- si indossino protezioni per gli occhi, quando c'è rischio per essi;
- bambini e/o studenti siano informati delle precauzioni di sicurezza per attività che richiedano l'uso di sostanze chimiche e microrganismi.

©Diritti d'autore

I diritti d'autore sono di proprietà dell'EIBE. Gli autori del modulo dichiarano di essere moralmente titolari del copyright secondo la Sezione 77 del *Designs, Patents and Copyright Act, UK(1988)*.

Uso didattico. La riproduzione elettronica o

stampati della totalità o di una parte del modulo sono autorizzati per l'uso didattico a condizione che le copie siano distribuite a prezzo di costo o ad un prezzo inferiore al costo di riproduzione e che vengano indicati gli autori e coautori detentori dei diritti d'autore.

Altri impieghi. Il modulo può essere utilizzato a fini non commerciali, ma non può essere diffuso elettronicamente, mailing list o bbs. Non può essere diffuso sul World Wide Web senza autorizzazione né in altro modo di distribuzione e riproduzione che si sostituirebbe ad un abbonamento o ad un'autorizzazione individuale d'accesso, né in altri modi che non rispettino queste condizioni.

Utilizzo commerciale. Per utilizzare parzialmente o integralmente questo modulo a fini commerciali o per altre pubblicazioni, dovete contattare:

Segreteria EIBE (Regina Rojek)
c/o IPN
Università di Kiel
D-24098 KIEL 1
Germania
tel: ++49 431 880 3166
fax: ++49 431 880 3132
e-mail: rojek@ipn.uni-kiel.de

Gruppo di lavoro

- Catherine Adley
Università di Limerick, EIRE
- Jan Frings
Hogeschool van Gelderland, Paesi Bassi
- Cecily Leonard
Università di Limerick, EIRE
- Eckard R. Lucius (Coordinatore della dispensa
Germania
- Marleen van Strydonck
Università di Antwerp, Belgio
- Paul E. O. Wymer
Society for General Microbiology, U.K.

Disegni, illustrazioni, impaginazione: Dean Madden, Caroline Shearer NCBE, University of Reading UK.

Traduzione: Maddalena Sturla, Università di Genova.

Ringraziamenti

L'EIBE è particolarmente grata a Liesbeth van de Grint (Hogeschool van Utrecht, Paesi Bassi) e John Schollar (National Centre for Biotechnology Education, Università di Reading, Regno Unito) per aver contribuito alla realizzazione di questo modulo e per aver organizzato e seguito il corso multinazionale in cui sono state testate le attività svolte in questo modulo. Gli insegnanti E. Vergauts, L. Daniels, L. Neels (Belgio); Dorte Hammelev (Danimarca); Lucienne Diemer, Gérard Coutouly (Francia); Thomas Jeb, Dr. U. Schnack; Dr. E. LipKow (Germania); A. de Graaf, Guus Smid, J. Gadener (Paesi Bassi); Rebecca Weston, Jane Gent, Derek Mackie, Sarah Whitethread, Maggie Parson (Regno Unito) hanno partecipato al corso fornendo utili commenti sul modulo.

Notizie sul Modulo N° 1



Questo modulo comprende una raccolta di attività che possono essere svolte indipendentemente l'una dall'altra o una di seguito all'altra come parte di un programma di insegnamento. Queste attività sono state realizzate da insegnanti e pedagoghi di molti paesi europei sostenuti finanziariamente e moralmente dalla DG XII della Commissione Europea per EIBE, European Initiative for Biotechnology Education

Tutte le attività sono state testate con cura in esercitazioni di laboratorio a cui hanno partecipato insegnanti di tutta Europa.

Le attività proposte in questo modulo consistono in:

1. Realizzazione di modelli poco costosi di una molecola di DNA e di differenti microrganismi. Lo scopo di queste esperienze è quello di mostrare le caratteristiche essenziali di questi sistemi e dare agli studenti l'opportunità di comprendere le reali dimensioni dei microrganismi.
2. Metodi semplici, sicuri e poco costosi per l'estrazione del DNA, che offrono agli studenti un'esperienza che comprende le tecniche di base e permette loro di vedere il materiale genetico.
3. Una serie di analisi che mettono in rilievo: la presenza di microrganismi nell'ambiente che ci circonda e la selezione di specie utili; alcuni dei prodotti che i microrganismi possono fornire (enzimi ed antibiotici). Due di queste analisi sono di tipo qualitativo; una si occupa di fare una stima quantitativa della produzione enzimatica.
4. Vari studi sugli effetti della crescita microbica, dalla semplice panificazione, a un'attività sulla fermentazione e infine alla valutazione diretta dell'azione metabolica del lievito. In ognuna di queste esperienze esiste un'ampia opportunità di stimolare e di approfondire le ricerche. Per motivare gli studenti le attività sono state selezionate in modo che abbiano una correlazione con applicazioni di biotecnologia, evitando di limitarsi a soli principi teorici.
5. Due esempi di attività che mostrano un

metodo naturale di trasferimento genetico, intesi come introduzione pratica ai principi di alterazione genetica.

Poiché due delle esperienze pratiche si occupano di produzione ed azione degli antibiotici e di trasferimento della resistenza batterica, sono incluse informazioni aggiuntive su questi argomenti.

Gli autori si sono preoccupati di proporre attività che risultassero una combinazione tra tecniche semplici e più avanzate, in modo che ogni insegnante di biologia possa trovare qualcosa di interessante e valido. Due appendici forniscono informazioni di base circa l'uso di tecniche di microbiologia nel laboratorio di scuola.

In futuro saranno disponibili guide supplementari, che forniranno dettagli su programmi, misure di sicurezza, disponibilità di materiali ed altre interessanti informazioni, distribuite nei paesi dell'Unione Europea.

Sono benvenute le critiche su questo materiale, specialmente dagli insegnanti, in quanto essi sono principalmente coinvolti. Commenti e richieste possono essere inviati a:

Eckhard R. Lucius
 Institut für die Pädagogik
 der Naturwissenschaften
 Universität Kiel
 Olshausenstr. 62
 D-24098 KIEL 1
 Germania
 Telefono: +49 (0) 431 880 3137
 Fax: +49 (0) 431 880 3132
 E-Mail: lucius@ipn.uni-kiel.de

Realizzazione di un modello di DNA

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Scopo del lavoro

Mostrare la configurazione fondamentale della struttura del DNA (acido desossiribonucleico)

Organizzazione

Occorrono circa 30 minuti per realizzare questo modello. Se si desidera colorare le parti dei ritagli (appartenenti a basi contrapposte) occorre più tempo.

Accessori e materiali

Occorrenti per ogni studente o gruppo di studenti

- Forbici
- Colla per carta, nastro biadesivo o una piccola cucitrice a punto metallico
Nota: è indicato il nastro biadesivo, sebbene tenda a staccarsi dopo un po' di tempo.
- Filo (per legare l'etichetta al modello e per appendere - a parete - il modello ultimato).

Nota: per ottenere un modello durevole, si possono incollare insieme uno sull'altro i due scheletri zucchero-fosfato.

Montaggio

1. Ritagliare lo scheletro zucchero-fosfato A e B.
2. Ritagliare le strisce di coppie di basi.
3. Ripiegare le alette ai lati opposti delle strisce.
4. Attaccare le alette di una estremità di ogni striscia negli spazi numerati lungo l'ossatura A. Le strisce possono essere incollate seguendo qualsiasi ordine (disporre orientate indifferentemente in un verso o nell'altro).
5. Attaccare le alette dell'altra estremità delle strisce al numero corrispondente sulla ossatura B.
6. Legare l'etichetta al modello di doppia elica, usando il filo. Le figure del testo possono essere usate per spiegare il modello, se si desidera.

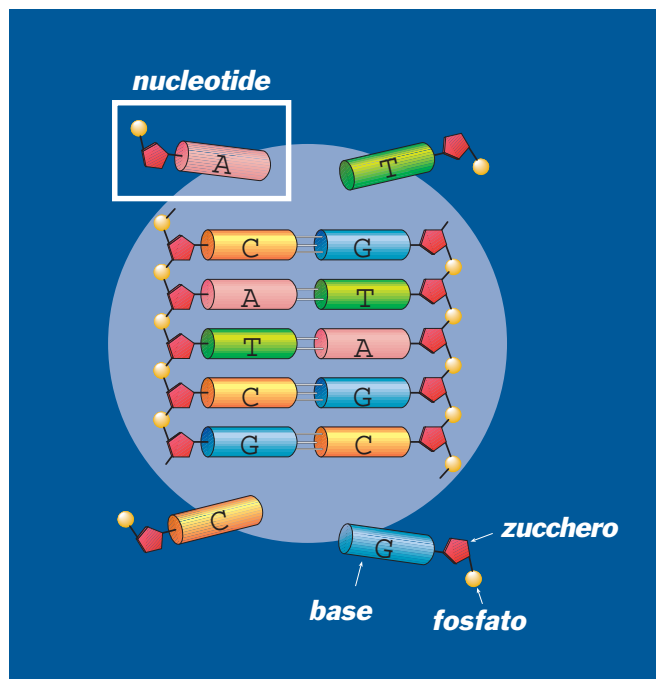
Ringraziamenti

Questo modello è stato realizzato sulla base di quello ideato da una organizzazione di ricerca di governo, il CSIRO in Australia, per il proprio "Double Helix" Science Club. EIBE è grato a CSIRO per l'idea originale e per aver permesso di modificare il loro modello.

	N°1	N°2			N°3
	T	C	A	G	
T	PHE PHE LEU LEU	SER SER SER SER	TYR TYR STOP STOP	CYS CYS STOP TRP	T C A G
C	LEU LEU LEU LEU	PRO PRO PRO PRO	HIS HIS GLN GLN	ARG ARG ARG ARG	T C A G
A	ILE ILE ILE MET	THR THR THR THR	ASN ASN LYS LYS	SER SER ARG ARG	T C A G
G	VAL VAL VAL VAL	ALA ALA ALA ALA	ASP ASP GLU GLU	GLY GLY GLY GLY	T C A G

Il codice genetico

Ogni sequenza di tre basi sul DNA a doppia elica codifica uno dei venti aminoacidi indicati al centro della tabella da un codice di tre lettere.



La struttura del DNA

Le catene di molecole di zucchero e fosfato costituiscono i due scheletri del DNA. Tra di esse, le quattro basi: timina, citosina, adenina e guanina sono unite da legami a idrogeno.

Modelli di Microrganismi



Per gli studenti spesso è difficile valutare le dimensioni dei microrganismi. Inoltre, hanno difficoltà ad immaginare la struttura tridimensionale dei microrganismi partendo dall'immagine bidimensionale osservata al microscopio.

Realizzando dei modelli, gli studenti sono in grado di riconoscere le principali caratteristiche, e di valutare le (rispettive) dimensioni dei microrganismi.

Da questa attività si ottengono migliori risultati se agli studenti si lascia la libertà di ideare modelli propri, piuttosto che seguire un disegno prestabilito. Per questo motivo il lavoro può essere completato meglio a casa (dove è disponibile una maggior quantità di materiali e di tempo).

Nota: per quei soggetti che non sono motivati nel realizzare il modello, può servire far notare loro che in biologia molecolare realizzare modelli è un metodo da tempo usato e valido, benché oggi i modelli reali sono stati largamente sostituiti dalle loro copie al computer.

Scopo del lavoro

- Mostrare le caratteristiche fondamentali della struttura del batteriofago lambda e di una varietà di batteri.
- Aiutare gli studenti a valutare le dimensioni dei virus e dei batteri.

Tempo di preparazione

Occorrono circa 30 minuti per realizzare il modello del batteriofago. Diversamente, se si desidera colorare il modello, il montaggio richiederà più tempo. A seconda della cura rivolta all'attività, il modello dei batteri può richiedere un'ora o più di lavoro.

Nota: questa attività si può assegnare come valido compito a casa.

Attrezzature e materiali

Occorrenti per ogni studente o gruppo di studenti.

- Libri di testo che mostrano la struttura di virus e batteri.
- Un assortimento di materiali idonei per realizzare il modello.
- Forbici.
- Colla, nastro adesivo o pinzatrice.
- Colori.

Istruzioni per gli studenti

Virus

Utilizzare il reticolo allegato per realizzare il modello del batteriofago lambda .

Batteri

Usare il materiale fornito per confezionare i modelli di batteri (bastoncini e cocci).

Per ciascuno dei vostri modelli:

1. Individuare quelle caratteristiche di base che sono visibili come, per esempio, membrane cellulari, materiale genetico;
2. Calcolare le dimensioni dell'organismo rappresentato dal vostro modello;
3. Pensare a un modo semplice per far capire a ragazzi più giovani le dimensioni reali del microrganismo rappresentato dal modello; per esempio, "se il batterio avesse queste dimensioni, tu (in proporzione) potresti essere grande come una casa".

Ulteriori applicazioni

Agli studenti si può chiedere anche di realizzare modelli di cellule di piante e/o di animali. Questo lavoro potrebbe aiutare a sottolineare le differenze tra procarioti ed eucarioti, e per richiamare l'attenzione sull'ipotesi di endosimbiosi temporanee (spiegando le supposizioni circa l'origine evolutiva degli eucarioti).

Informazioni

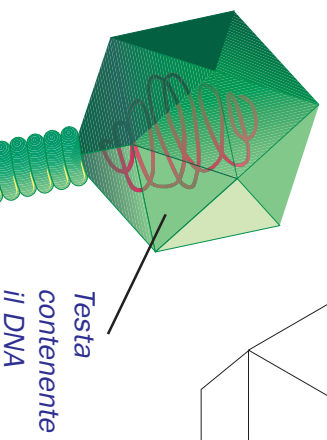
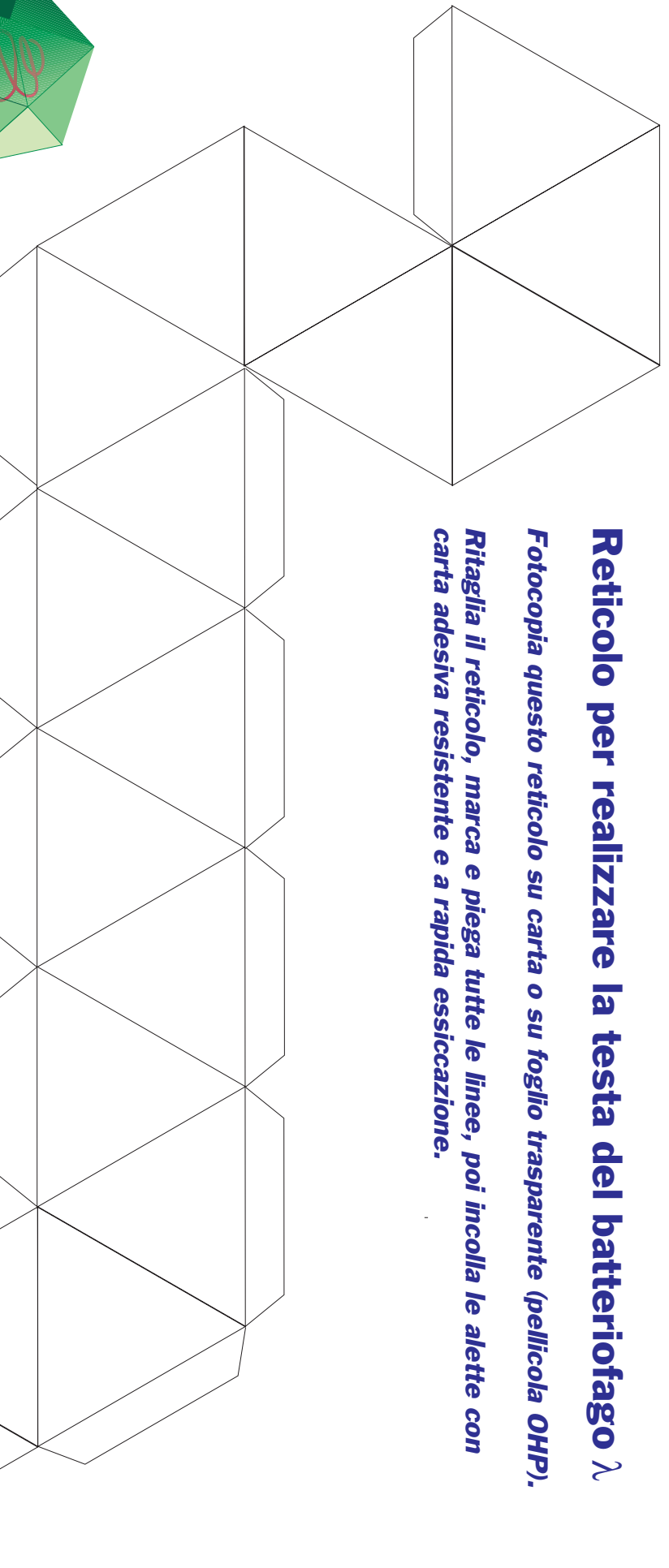
Le attività riguardanti la realizzazione di modelli sono descritte anche nella seguente pubblicazione:

Nicholl, L. and Nicholl, D (1987) Modelling the eukaryotic chromosome: a stepped approach. *Journal of Biological Education* **21** (2) 99-104.

Reticolo per realizzare la testa del batteriofago λ

Fotocopia questo reticolo su carta o su foglio trasparente (pellicola OHP).

Ritaglia il reticolo, marca e piega tutte le linee, poi incolla le alette con carta adesiva resistente e a rapida essiccazione.



Testa
contenente
il DNA

Il filamento di DNA può essere rappresentato servendosi di un tratto di spago o filo metallico.

Per realizzare la coda utilizzate le cannuce (il tipo flessibile, corrugato e allungato rende il modello più realistico).

Estrazione di DNA da batteri



In questa attività viene utilizzato un lisozima (un enzima) per degradare le pareti cellulari di batteri e detergenti d'uso domestico per distruggere le membrane cellulari interne, liberando gli acidi nucleici (DNA o RNA).

Scopo del lavoro

Estrarre gli acidi nucleici dal batterio *Escherichia coli* K-12.

Preparazioni

Occorre preparare colture di batteri, sviluppatasi su brodo nutriente almeno 4 giorni prima (solo le colture batteriche mature forniscono quantità significative di acidi nucleici).

Tempo di preparazione

Per compiere questa attività occorrono circa 50 minuti, compreso un periodo di 30 minuti durante il quale i batteri vengono incubati con l'enzima.

Attrezzature e materiali

Occorrenti per ogni studente o gruppo di studenti

- Colture mature di *Escherichia coli* K-12 (vd. preparazioni)
- Lisozima liofilizzato - solo una piccolissima quantità che può essere prelevata con la punta di una spatola se occorre
- 6 ml di alcool freddo, (IMS é idoneo)
- 0.5 ml di detergenti d'uso domestico, per esempio, Woolite (Reckitt & Colman),
- Ansa da inoculo
- 2 ml di acqua distillata,
- 2 provette,
- Pipette o siringhe in plastica da 1 ml, per distribuire acqua o soluzione contenente lisozima
- Bagno termostato, settato a 60 °C
- Incubatore, settato a 37 °C

Procedimento

1. Preparare una coltura di *Escherichia coli* K-12, almeno 4 giorni prima di quando si vuole estrarre il DNA.

2. Aggiungere una piccola quantità di lisozima a 5 ml di una sospensione di batteri e mischiare bene
3. Incubare la miscela per 30 minuti a 37 °C
4. Aggiungere 0.5 ml di detergente alla miscela di batteri
5. Incubare la miscela per 2 minuti a 60°C in un beaker d'acqua
6. Lasciare raffreddare la miscela in acqua fredda per pochi minuti
7. Versare nella provetta lentamente e con molta attenzione l'alcool freddo formando uno strato sulla superficie della miscela
8. Gli acidi nucleici tendono a separarsi dalla miscela passando nello strato più superficiale (alcool)

Ulteriori applicazioni

1. Si può colorare il DNA, per esempio, usando orceina acetica o una soluzione di blu di metilene.

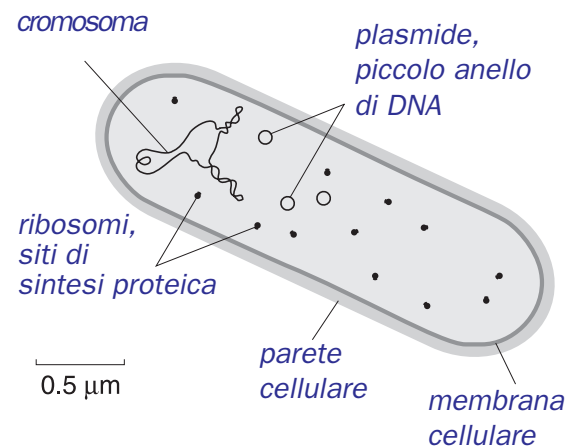
Misure di sicurezza

Quando si manipolano le colture batteriche occorre osservare le misure di sicurezza di microbiologia standard (bisogna fare attenzione quando si usa acqua calda passo n°5).

Ringraziamenti

Questo modello si è ottenuto semplificandone uno ideato da Hertel et al. e Submuth et al. (1987) che hanno isolato il DNA dal *Bacillus subtilis*. Si ringrazia il professore Joseph Lengeler di Osnabruch per il suggerimento di usare detergenti d'uso domestico in questo lavoro.

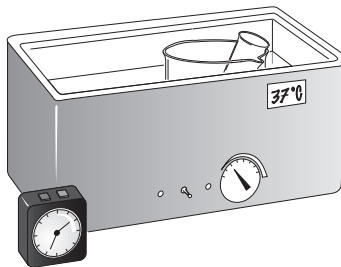
Una tipica cellula batterica dove è visibile la posizione degli acidi nucleici ed il punto in cui agiscono il lisozima e il detergente (sulla parete e membrana cellulare).



1**2**

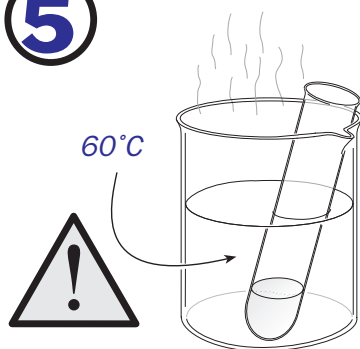
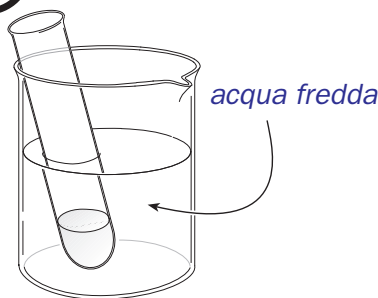
1. Preparare una coltura di E. coli K-12 su brodo nutriente.

2. Aggiungere una piccola quantità di lisozima a 5 ml di sospensione batterica e miscelare bene.

3**4**

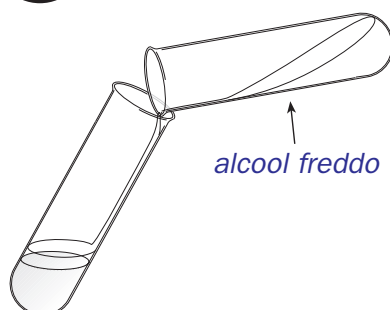
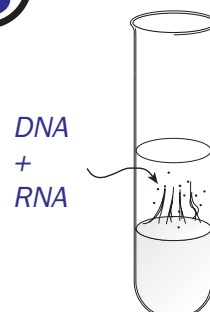
3. Incubare la miscela per 30 minuti a 37 °C.

4. Aggiungere 0.5 ml di detergente d'uso domestico alla sospensione batterica.

5**6**

5. Incubare la provetta contenente la miscela per 2 minuti a 60 °C in un beaker d'acqua.

6. Far raffreddare la miscela in acqua fredda per pochi minuti.

7**8**

7. Versare lentamente e con molta attenzione l'alcool freddo formando uno strato sulla superficie della miscela.

8. Gli acidi nucleici (sottili filamenti bianchi) passano nello strato superiore (alcool).

Come estrarre il DNA dalla cipolla

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Questo è un metodo di estrazione del DNA e del RNA dal tessuto di organismi vegetali. Prima di tutto il tessuto viene frammentato; per degradare sia le membrane cellulari che quelle nucleari viene impiegato del detergente d'uso domestico. I frammenti cellulari sono separati per filtrazione; rimangono gli acidi nucleici e le proteine solubili. Viene impiegato un enzima per degradare le proteine, poi l'acido nucleico viene messo in alcool etilico freddo.

Scopo del lavoro

Isolare gli acidi nucleici dal tessuto della cipolla.

Nota bene: gli acidi nucleici preparati in questo modo non saranno molto puri.

Preparazione

L'alcool etilico impiegato deve essere molto freddo. Occorre mettere in frigo dentro una bottiglia di plastica almeno 24 ore prima di iniziare l'esperimento.

Tempo di preparazione

Quest'attività richiederà circa 5 minuti, incluso un periodo di incubazione di 15 minuti.

Attrezzature e materiali

- frullatore
- asciugacapelli
- coltello da insalata affilato e tagliere
- imbuto largo in plastica
- acqua a 60 °C (bagnetto termostato settato a 60 °C)
- ghiaccio in una caraffa
- 2 caraffe da 250 ml
- carta da filtro da caffè (non usare carta da filtro per laboratorio)
- cipolla grande come una palla da tennis
- 10 ml di detergente d'uso domestico
- 3 gr. sale da tavola
- 100 ml acqua distillata
- siringa di plastica 10 ml (senza ago) per misurare i liquidi
- provetta resistente al calore
- barretta di vetro per mescolare
- enzima proteolitico 2-3 gocce
- 6 ml circa di alcool etilico freddo - direttamente tolto dal frigo (è adatto anche IMS)

Procedimento

1. Mescolare il sale da tavola con il detergente per i piatti e portare ad un volume di 100 ml con acqua distillata;
2. Tritare la cipolla grossolanamente per 5 min;
3. Mettere la cipolla tritata nella caraffa con la soluzione di sale e detergente;
4. Mettere la caraffa in acqua a 60 °C per 15 minuti esatti;
5. Raffreddare il composto immergendo la caraffa in acqua fredda per 5 minuti, mescolando spesso;
6. Versare la miscela nel frullatore e frullare per non più di 5 secondi;
7. Versare la miscela in una secondo caraffa. Assicurarsi che la schiuma che si è formata non contamini la soluzione;
8. Aggiungere 2-3 gocce di proteasi a 10 ml di estratto di cipolla in una provetta e mescolare bene;
9. Versare lungo il bordo della provetta l'alcool etilico con attenzione in modo da formare uno strato sulla superficie dell'estratto di cipolla. Non toccare la provetta per alcuni minuti;
10. Gli acidi nucleici si posizioneranno nello strato più alto.

Ulteriori applicazioni

- Il DNA può essere colorato usando una soluzione di aceto-orceina o blu di metilene.
- Il DNA può anche essere estratto da tessuti animali (per es. uova di merluzzo, fegato, timo e animelle di vitello). L'utilizzo di un mortaio con il pestello, invece di un frullatore, è un metodo delicato per rompere il tessuto sicuri che il DNA non venga danneggiato.

Avvertenze

Questo metodo non presenta particolari pericoli, tuttavia bisogna porre attenzione quando si trita la cipolla con il frullatore

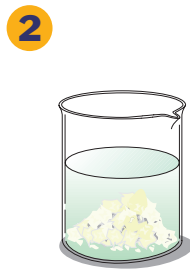
Ringraziamenti

Questa metodica è stata adattata da *A Sourcebook of Biotechnology Activities* di Alison Rasmussen e Robert Matheson (1990) National Association of Biology Teachers/North Caroline Biotechnology Centre. ISBN: 0 941212 09 2
L'intera pubblicazione è reperibile presso NABT, 11250 Roger Bacon Drive #19, RESTON, VIRGINIA 22090, USA.



1
10 ml detergente
3 gr sale da tavola
100 ml acqua
1 cipolla di media grandezza

Mescolare il sale da tavola con il detergente per i piatti e portare ad un volume di 100 ml con acqua. Agitare bene per sciogliere il sale ↗



2
Mettere la cipolla tritata nella soluzione di acqua e sale

Il detergente per i piatti rompe le membrane di ogni cellula liberando dal nucleo il DNA ↗



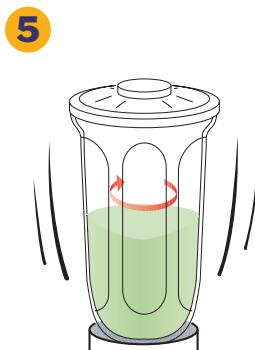
3
Mettere la caraffa in acqua a 60 °C per 15 minuti

L'alta temperatura facilita il processo
 e denatura la DNasi che potrebbe degradare il DNA ↗



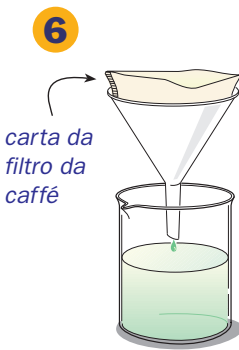
4
Raffreddare il composto immergendo la caraffa per pochi minuti in un contenitore di ghiaccio

..... ma lasciarlo troppo a lungo potrebbe frammentare il DNA per questo è necessario del ghiaccio ↗



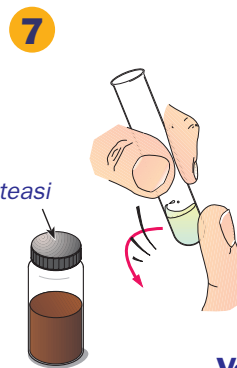
5
Frullare per non più di 5 sec.

Il frullatore aiuta a rompere le cellule della cipolla, ma non frullare troppo altrimenti il DNA potrebbe frantumarsi ↗



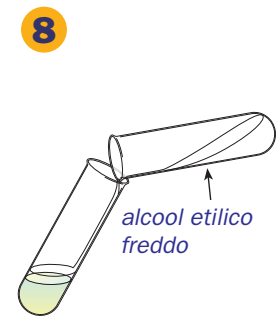
6
Filtrare la miscela frullata

Questa operazione separa il materiale che costituiva la parete cellulare dal DNA e dalle proteine che sono ora nella soluzione ↗



7
Aggiungere 2-3 gocce di proteasi a 10 ml di estratto di cipolla

La proteasi (ne occorre poca) digerisce le proteine in soluzione ↗



8
Versare lungo il bordo della provetta un eguale volume di alcool etilico freddo, con attenzione, in modo da formare uno strato sulla superficie dell'estratto di cipolla

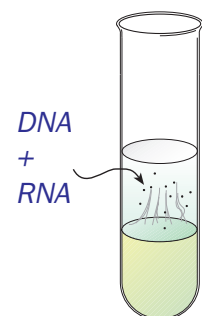
L'alcool * DEVE essere freddo-metterlo nel congelatore la notte prima * puoi utilizzare l'alcool d'uso commerciale ↘

Estrazione del DNA dalla cipolla

9

Il DNA forma uno strato sulla superficie dell'alcool

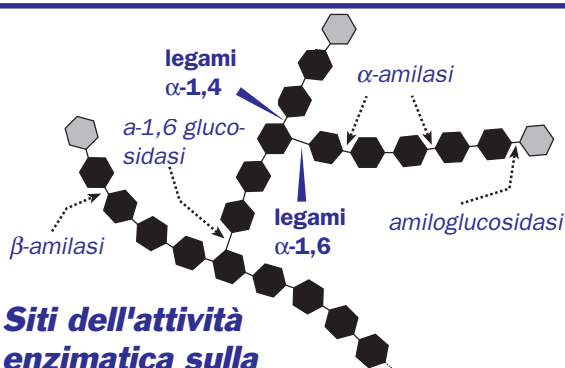
Il DNA non si scioglie nell'alcool-quindi si distribuisce sullo strato superficiale dell'alcool



Produzione di amilasi da parte dei microrganismi presenti nel terreno



L'amido è costituito da unità di glucosio legate fra loro a formare un polimero lineare chiamato amilosio o un polimero ramificato chiamato amilopectina. Questi polimeri vengono scissi da amilasi extracellulari che sono sintetizzati da molte specie di microrganismi, compresi batteri e funghi. Sono stati studiati un grande numero di microrganismi per individuare quelli più adatti da impiegare per una produzione commerciale di enzimi. In questo esperimento, si analizzano i microrganismi presenti nel terreno per esaminare la produzione enzimatica extracellulare.



Siti dell'attività enzimatica sulla amilopectina

Nell'amilosio e nell'amilopectina le unità di glucosio sono unite tra loro da legami $\alpha-1,4$; nell'amilopectina, le ramificazioni laterali si legano a queste catene con legami $\alpha-1,6$. Le principali amilasi presenti in commercio sono:

α -amilasi, che idrolizza legami $\alpha-1,4$ nei polimeri di glucosio, ma solo all'interno delle catene, liberando catene più corte (destrine). Commercialmente si ricava da batteri (es. *Bacillus spp.*).

β -amilasi, che idrolizza legami $\alpha-1,4$ nei polimeri di glucosio, spezzando il legame fra unità di maltosio adiacenti a partire dalla estremità della catena. Non idrolizza legami $\alpha-1,6$. Commercialmente si ricava da orzo e malto.

amiloglucosidasi, che spezza legami $\alpha-1,4$, separando unità di glucosio progressivamente da una estremità delle catene. Idrolizza anche legami $\alpha-1,6$, ma difficilmente. Commercialmente si ricava dai funghi *Aspergillus spp.* e *Rhizopus oryzae*.

$\alpha-1,6$ -glucosidasi che spezza legami $\alpha-1,6$. Commercialmente si ricava dai batteri *Bacillus acidopullulyticus* e *Klebsiella pneumoniae*.

Scopo del lavoro

Indagare la produzione di amilasi da parte di microrganismi cresciuti naturalmente nel terreno.

Cognizioni indispensabili

E' necessario che gli studenti conoscano le metodiche standard di microbiologia, comprese la capacità di lavorare in un ambiente asettico, mantenendolo tale. E' d'aiuto conoscere la reazione amido-iodio.

Preparazione

La soluzione di iodio deve essere preparata almeno un giorno prima. I cristalli di iodio richiedono del tempo per dissolversi completamente in acqua.

Amido/agar nutriente e bottiglie d'acqua sterile devono essere preparate prima della lezione. Sarebbe ideale seccare all'aria i campioni di terreno prima dell'uso.

Bastoncini cotonati sterili. I bastoncini cotonati in commercio hanno un'astina in plastica che potrebbe fondersi nel caso venissero autoclavati. Alcuni bastoncini cotonati presenti in commercio potrebbero essere adatti in quanto sono stati trattati con un agente antimicrobico. Per questa analisi preparate voi stessi i bastoncini avvolgendo dell'ovatta attorno alla punta di una bacchetta da cocktail. Autoclavare poi i bastoncini in una bottiglia Mc-Cartney o liberi avvolti in un foglio di alluminio a 121°C per 15 minuti.

Tempo di preparazione

Preparazione ed incolo delle piastre Petri: 45 minuti
Analisi dei risultati, 2-3 giorni dopo: 15 minuti

Attrezzatura e materiale

Occorrente per ogni studente o gruppo di studenti (Si suppone che anche l'attrezzatura di un normale laboratorio sia idonea)

- Una piastra Petri contenente 15-20 ml di amido/agar nutriente sterile, preparato con un agar nutriente, presente in commercio, che contiene 0.2% di amido solubile aggiunto;
- 1 g di terreno disidratato, prelevato da una superficie di 10 cm;
- Una soluzione contenente iodio, preparata sciogliendo 1 g di cristalli di iodio e 2 g di potassio in 300 ml d'acqua distillata;
- 15 ml d'acqua distillata sterile contenuta in una bottiglia McCartney;
- Bastoncini di ovatta sterili preparati da voi; (vd. preparazione)
- Un pennarello (per scrivere sulla piastra Petri).

Procedimento

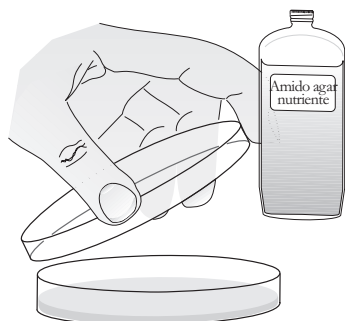
1. Versare 1 g di terreno disidratato in 15 ml d'acqua distillata sterile. Agitare bene per disperdere il terreno.
2. Inoculare la piastra con l'amido/agar nutriente, servendosi di un bastoncino munito di ovatta sterile per distendere la sospensione di terreno sulla superficie dell'agar.
3. Scrivere sull'esterno della piastra Petri le vostre iniziali, la data e la provenienza dell'inoculo.
4. Incubare la piastra inocolata, capovolta, per 2-3 giorni a 30 °C.
5. Trascorso il tempo di incubazione, facendo attenzione, versare la soluzione di iodio nelle piastre fino a che l'intera superficie dell'agar sia coperta da 1 mm di soluzione. Le zone dove l'amido è ancora presente si tingono di un colore blu-nero (le molecole di iodio si dispongono nello spazio centrale delle catene elicoidali delle molecole di glucosio nell'amido). Macchie di colore marrone chiaro (il colore

della soluzione di iodio) si sviluppano lungo i margini delle colonie di microrganismi se questi hanno degradato l'amido.

Misure di sicurezza

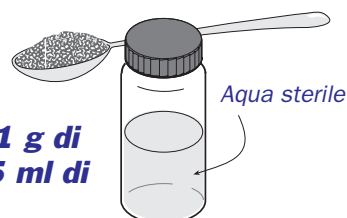
IMPORTANTE: In alcuni paesi, può essere proibito svolgere questo esperimento, perché non è consentito aprire dopo l'incubazione le piastre inoculate con organismi ignoti. In tal caso, è possibile usare al posto dei microrganismi del terreno una coltura di *Bacillus subtilis*. Occorre osservare misure di sicurezza standard di microbiologia quando si esegue questo lavoro e quando si manipolano colture, sebbene tecniche di asetticità non siano strettamente necessarie per inoculare le piastre. Non è opportuno utilizzare sottocolture (non identificate) prelevate da piastre inoculate. Lo iodio è tossico e deve essere maneggiato con attenzione.

①



Preparare una piastra Petri con amido/agar nutriente sterile

②



Sospendere 1 g di terreno in 15 ml di acqua sterile

③

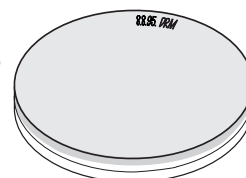


Inoculare l'agar con la sospensione, servendosi di un bastoncino munito di ovatta sterile

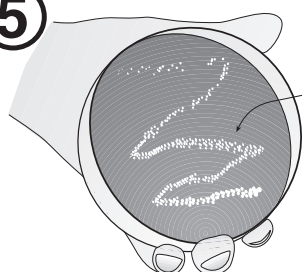
④

Incubare la piastra a 30°C per 2-3 giorni

Incubare la piastra capovolta



⑤



Le zone chiare non contengono amido

Colorare la piastra con la soluzione di iodio, per individuare le zone dove l'amido è stato idrolizzato

Sintesi di cellulasi



E' di grande interesse l'utilizzo della cellulosa di scarto come substrato disponibile per i processi di fermentazione, così da convertire a basso costo materiali grezzi in prodotti di maggior valore. La maggior parte delle cellulasi commerciali sono prodotte con fermentazioni anaerobiche del fungo *Trichoderma reesei*. Tuttavia il batterio *Cellulomonas* cresce più rapidamente in una piastra Petri e la sintesi extracellulare di cellulasi è più facile da misurare.

Scopo del lavoro

Fornire un saggio quantitativo della sintesi di cellulasi da parte di *Cellulomonas*.

Preparazione

Occorre preparare colture di *Cellulomonas* su brodo nutriente (es. in bottiglie McCartney), da usare in classe. Questo dovrebbe essere fatto due o tre giorni prima di svolgere l'esperimento pratico. Le colture devono essere incubate a 25-30 °C.

Terreno CMC contenente:

0.5 g carbossimetilcellulosa (CMC) (forma solubile di cellulosa); 0.1 g NaNO₃; 0.1 K₂HPO₄; 0.1 g KCl; 0.05 g MgSO₄; 0.05 g estratto di lievito; e 0.1 g glucosio sciolto in 100 ml d'acqua. Il terreno assume consistenza con l'aggiunta di 1.7 % w/v agar.

Tempo di preparazione

Preparazione ed inoculo delle piastre Petri: 45 minuti

Valutazione dei risultati, 2-3 giorni dopo: 15 minuti

Attrezzatura e materiali

Occorrente per ogni studente o gruppo di studenti (Si suppone che anche l'attrezzatura di un normale laboratorio sia disponibile)

- Coltura di *Cellulomonas* sp.
- Piastra Petri sterile, contenente 15 ml di terreno CMC sterile (vd. preparazione soprascritta)
- Acqua sterile (conservata in una bottiglia McCartney)
- Siringhe sterili da 1 ml (prive d'ago), una o due pipette dotate di stantuffo per aspirare e due pipette sterili accessoriate di filtro da inserire nelle precedenti

- Un beaker per i rifiuti contenente una soluzione al 5% di Clorato I es. Domestos (Lever)
- Una soluzione di Rosso Congo (preparata sciogliendo 1 mg per ogni ml d'acqua)
- Una soluzione 1M di sodio cloruro
- Alcool (per sterilizzare con la fiamma il cilindretto forato)
- Cilindretto forato, del diametro di 5 mm
- Incubatore settato a 25-30 °C
- Penna per scrivere sulle piastre Petri

Procedimento

1. Immergere un cilindretto forato del diametro di 5 mm nell'alcool. Passare sulla fiamma il cilindretto e lasciar bruciare tutto l'alcool.
ATTENZIONE! Mantenere il cilindretto in posizione orizzontale mentre si fa ciò, in modo che la fiamma non possa penetrare all'interno del cilindretto e bruciarsi le mani.
2. Sollevare il coperchio della piastra inclinandola leggermente su un lato e, utilizzando il cilindretto, praticare un pozzetto nell'agar. Rimuovere il dischetto d'agar dal cilindretto se necessario usando un ago montato.
3. Ripetere i passi 1 e 2 per ottenere due pozzetti nell'agar.
4. Marcare ogni pozzetto sulla base della piastra Petri. Una sigla adatta potrebbe essere: C (per *Cellulomonas*); A (per acqua sterile, come controllo).
5. Nei pozzetti specifici porre 0.2 ml della vostra coltura batterica o acqua sterile, utilizzando siringhe o pipette diverse per ogni pozzetto. Porre le siringhe, non appena sono state utilizzate, nel beaker con il disinfettante.
6. Incubare le piastre per una settimana a 25-30 °C. Il *Cellulomonas* può sviluppare delle zone chiare oltre i 16 mm di diametro dopo 48 ore a 30 °C.

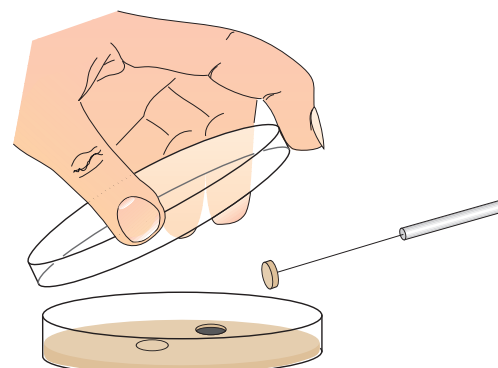
Dopo l'incubazione...

7. Ricoprire la placca con una soluzione di Rosso Congo per 15 minuti, poi decolorare con una soluzione di sale per 10-15 minuti. Le zone incolore indicano i punti in cui la CMC è stata idrolizzata liberando beta-(1->4)glucani che contengono sette o pochi residui di glucosio. Il diametro della zona chiara può essere misurato per determinare un confronto quantitativo di attività cellulasica.

Sintesi di cellulasi

1. **Sterilizzare sulla fiamma il cilindretto forato precedentemente immerso nell'alcool**

ATTENZIONE!
L'alcool è infiammabile

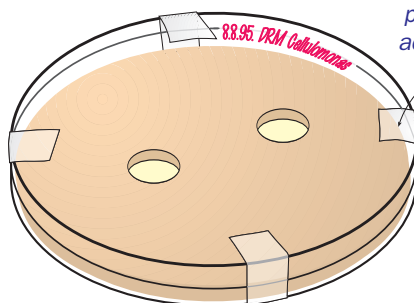


2. **Rimuovere due dischetti dall'agar contenuto nella piastra, formando due pozzetti**

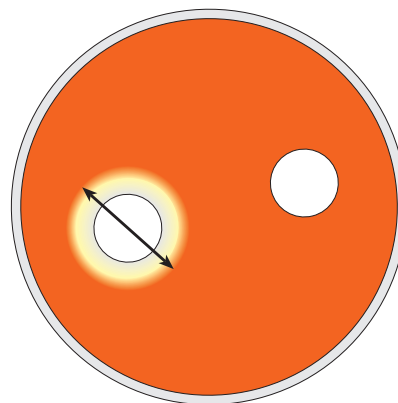
3. **Inoculare in uno dei pozzetti la coltura di Cellulomonas**
Riempire l'altro pozzetto con acqua sterile

4. **Incubare la piastra a 30 °C per 48 ore**

Fissare il coperchio della piastra Petri con nastro adesivo senza chiuderla ermeticamente



5. **Colorare la placca d'agar**
Misurare il diametro della zona in cui la cellulosa è stata degradata



Ulteriori applicazioni

1. Sospensioni di terreno possono essere pipettate nei pozzetti della piastra per esaminare l'attività cellulastica della flora microbica presente.
2. Lo stesso lavoro può essere applicato per saggiare l'attività cellulastica dei preparati di cellulasi commerciale.
3. Il decorso dell'esaurimento della cellulasi può essere seguito per diversi giorni utilizzando copie di piastre.

Misure di sicurezza

Quando si svolge questo esperimento occorre osservare le misure di sicurezza standard sulle tecniche di microbiologia e di asetticità.

IMPORTANTE: Se nei campioni di terreno sono presenti dei microorganismi ignoti che sintetizzano cellulasi, norme locali possono vietare di riaprire le piastre dopo l'incolo.

Produzione di antibiotico



Molti microrganismi producono antibiotici - sostanze che inibiscono la crescita o neutralizzano i loro competitori batterici. A partire dalla scoperta dell'efficacia della penicillina nel 1940 (prodotta dal fungo *Penicillium*), queste sostanze hanno raggiunto una notevole importanza nella lotta contro le malattie.

Oggi, i più importanti antibiotici sono prodotti dal batterio *Streptomyces*. Maggiori informazioni circa l'azione degli antibiotici ed il fenomeno di resistenza batterica sono riportati nelle pagine seguenti.

Scopo del lavoro

Dimostrare la produzione dell'antibiotico streptomicina da parte di *Streptomyces griseus* e verificare il suo effetto sulla crescita di una varietà di microrganismi.

Cognizioni indispensabili

Origine ed effetti degli antibiotici; lo sviluppo ed il diffondersi della resistenza agli antibiotici. (Consultare il testo di supporto)

Sotto:

Una coltura di *Streptomyces griseus* di tre giorni (sinistra). Gli organismi test sono (dall'alto):

Candida utilis, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*.



Preparazione

Occorrono colture attive di *Streptomyces griseus*. Queste devono avere un tempo di crescita di 2-3 giorni in piastre, ognuna contenente 15-20 ml di terreno di coltura agar di base.

Precedentemente bisogna preparare una coltura con la quale inoculare queste piastre. Per fare ciò, risospingere una piccola quantità di *Streptomyces* prelevato da una coltura in 1 ml di brodo di base sterile, poi pipettare in una provetta di test contenente 5 ml di brodo di coltura di base. Incubare la coltura per 24 ore a 30 °C.

Inoculare la Petri con la coltura di *Streptomyces*, che è stata posta in incubazione per la notte, distendendo sulla piastra una singola striscia di coltura verticale praticata più a sinistra possibile in modo che la parte destra del terreno di coltura resti sterile.

Incubare le piastre per 3-4 giorni a 30 °C.

Preparare, inoltre, colture test di organismi lasciandole in incubazione per una notte (scegliendo tra *Bacillus mycoides*, *Candida utilis*, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*)

Tempo di preparazione

Preparazione dei terreni e degli inoculi:	60 minuti +
Incubazione antecedente della coltura di <i>Streptomyces</i> :	24 ore, poi in aggiunta 72-96 ore +
Inoculazione delle piastre:	20 minuti +
Incubazione:	24-72 ore

Attrezzature e materiali

Occorrenti per ogni studente o gruppo di studenti (Si suppone che anche l'attrezzatura di un normale laboratorio sia idonea)

- Accesso ad un incubatore, settato a 30 °C.
- Ansa da inoculo
- Piastra Petri sterile, contenente 15-20 ml di terreno di coltura agar di base, nel quale è stata praticata una striscia di *Streptomyces griseus* lasciato accrescere per 48-72 ore (vedere preparativi preliminari, sopra)
- Una varietà di microrganismi scelti fa quelli sotto elencati, posti su agar inclinato, come organismi test* :
 - *Candida utilis* (un lievito)
 - *Micrococcus luteus* (un batterio)
 - *Pseudomonas fluorescens* (un batterio)
 - *Bacillus mycoides* (un batterio)
 - *Escherichia coli* K-12 (un batterio)

*Per informazioni riguardanti l'uso di questi organismi nelle scuole fare riferimento alle regole locali (l'uso di alcuni di questi organismi in certi Paesi può essere proibito).

Procedimento

- Inoculare ogni piastra marcata con *Streptomyces griseus* con il test di organismi, come segue:
 - Sterilizzare l'ansa da inoculo passandola attraverso la fiamma del Bunsen e lasciarla raffreddare brevemente.
 - Colmare l'ansa sterile con una coltura di organismi, quindi praticare una singola striscia orizzontale per ogni tipo di organismo nella parte di terreno rimasta libera (a sinistra dello *Streptomyces griseus*). Le strisce devono sempre essere ad angolo retto rispetto alla coltura di *Streptomyces griseus*, e terminare al margine di essa **IMPORTANTE! Non toccare la coltura di *Streptomyces griseus*, con l'ansa.**
 - Risterilizzare l'ansa da inoculo passandola attraverso la fiamma un'altra volta.Ripetere (a)-(c) per ogni test di coltura.
- Incubare le piastre per 2 giorni a 30 °C.
- Esaminare le piastre.

Misure di sicurezza

Questo lavoro deve essere svolto in laboratorio. Occorre seguire le misure di sicurezza microbiologiche standard quando si esegue l'esperimento e quando si dispongono le colture nelle piastre.

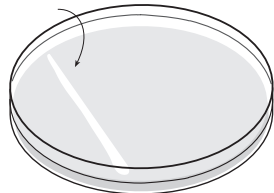
La quantità di antibiotico prodotto in queste analisi non costituisce pericolo.

Nota

Lo *Streptomyces griseus* produce l'antibiotico streptomina che diffonde nel terreno di coltura. Streptomina ed antibiotici alleati interferiscono con la sintesi proteica legandosi con il componente ribosomiale 30S dei batteri. Alcuni organismi (*Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) sono sensibili, altri (*Pseudomonas fluorescens*) sono resistenti. I lieviti (*Candida utilis*) non vengono colpiti dalla streptomina in quanto essi sono eucarioti con differenti strutture ribosomiali. Per maggiori informazioni, riferirsi al testo di supporto, che descrive la produzione di antibiotico e l'azione in dettaglio.

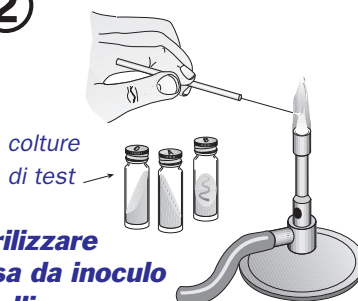
Produzione di antibiotico

① *singola striscia a destra della piastra*



Preparare una piastra Petri con la coltura di *Streptomyces griseus* 3-4 giorni prima.

②



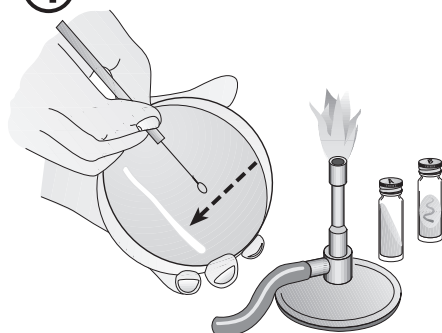
Sterilizzare l'ansa da inoculo metallica.

③



Praticare una striscia per un test di coltura nella piastra contenente *Streptomyces griseus*.

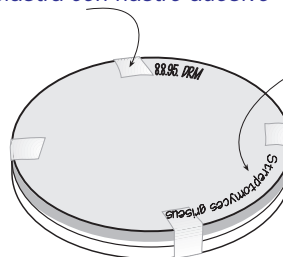
④



Ripetere per ogni test di coltura. Ricordarsi di sterilizzare l'ansa di inoculo dopo ogni applicazione.

⑤

sigillare leggermente la piastra con nastro adesivo



marcare la base della piastra

Incubare la piastra, capovolta, per 2-3 giorni a 30 °C.

La panificazione



La panificazione è uno dei più antichi esempi di biotecnologia, che annovera pane lievitato risalente all'antico Egitto (4.000 a.C.). Nel Regno Unito, il pane tradizionalmente viene prodotto con un impasto a base di farina di grano, acqua, sale e possibilmente grasso, a seconda della ricetta. Questo origina una matrice in cui viene inglobato il lievito. Nella farina inumidita l'enzima amilasi converte l'amido in glucosio, che è di nutrimento alle cellule di lievito intrappolate nella pasta.

Inoltre, il lievito necessita di una fonte di azoto. Energia ed aminoacidi sono forniti dalla parziale idrolisi delle proteine della farina (comunemente chiamata glutine). La respirazione anaerobica del lievito genera anidride carbonica ed alcool.

Il glutine porta elasticità e plasticità alla pasta e in tal modo l'anidride carbonica sviluppatasi, resta intrappolata ad accrescere le bolle d'aria all'interno della pasta, provocando la lievitazione.

Scopo del lavoro

Questo traccia di protocollo può essere utilizzata per osservare gli effetti dei differenti ingredienti delle ricette che alterano sia le proteine di farina, sia l'attività enzimatica.

Tempi di preparazione

L'esperimento può essere svolto in 50 minuti, a seconda delle condizioni in cui si svolge (temperatura, ecc.).

Attrezzatura e materiali

Per ogni impasto

- 1 g di lievito idratato
- 75g di farina di grano duro
- 50 ml di acqua
- Ingredienti facoltativi es. acido

ascorbico (vitamina C), α -amilasi, bromato di potassio (vd. *Ulteriore applicazione*, sotto)

- Piccoli contenitori in cui preparare la pasta
- Una bacchetta di vetro resistente per amalgamare la pasta
- Due cilindri in vetro graduati da 100 ml
- Un cronometro

Procedimento

1. Ricostituire il lievito disidratato in acqua.
Aggiungere la farina e miscelare bene.
2. Modellare la pasta a forma di salsiccia e porla in uno dei cilindri graduati.
3. Annotare il livello della pasta nel cilindro ogni dieci minuti per un'ora.

Ulteriori applicazioni

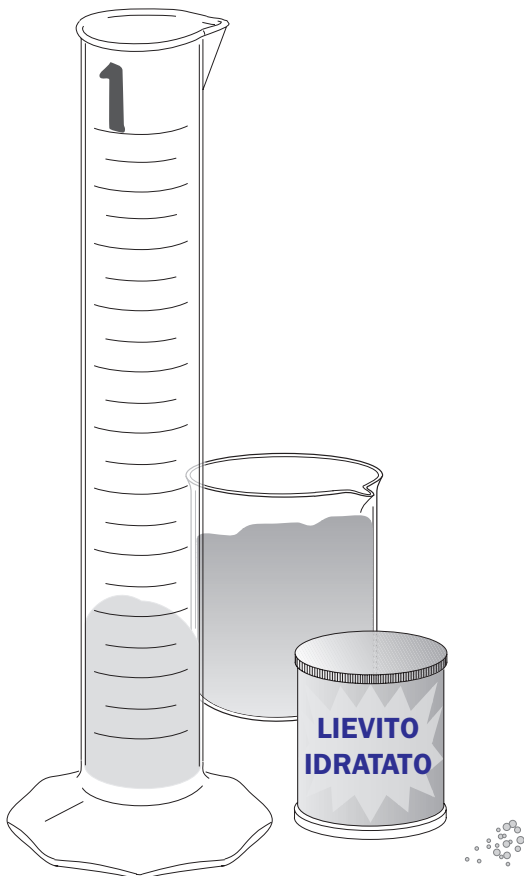
1. Quale effetto provocano differenti tipi di lievito disidratato nella lievitazione della pasta? (es. un normale lievito disidratato rispetto ad una miscela di lievito fresco).
2. Che differenze si osservano nella lievitazione della pasta usando diversi tipi di farina? (es. farina bianca di grano duro, farina bianca di grano tenero. La farina di grano duro contiene molto glutine, ma poco alfa-amilasi. La farina di grano tenero è ricca di alfa-amilasi.)
3. Quale miglioramento porta l'acido ascorbico (vitamina C) alla lievitazione della pasta? L'acido ascorbico interagisce con gli enzimi nella pasta, limitando la formazione dei legami di sulfidrilici tra le proteine di glutine.
4. Che effetti comporta l'aggiunta di alfa-amilasi alla lievitazione della pasta? Come si possono spiegare le differenze rilevate?
5. La farina impoverita di bromato di potassio favorisce la formazione di legami di sulfidrilici tra proteine di glutine adiacenti, perciò forma una pasta più elastica e malleabile. Certo troppa malleabilità può indebolire la pasta.
6. Il sale inibisce l'attività delle proteasi,

perciò impedisce che il glutine si trasformi in una massa collosa che non può trattenere l'anidride carbonica. Un eccesso di sale forma forti legami ionici fra catene adiacenti di molecole proteiche, rendendole meno deformabili e portando a un pane duro. Un eccesso di sale inoltre inibisce la crescita del lievito. Provare a determinare il giusto contenuto di sale nella pasta.

Ulteriori informazioni

On food and cooking. The science and lore of the kitchen di Harold McGee (1991) Harper Collins Publishers. **ISBN: 0 00412657 2.**

Pritchard, P. E. (1992) *Studies on the bread-improving mechanism of fungal alpha-amylase* Journal of Biological Education **26**, (1) 12-18.



RICETTA BASE PER LA PASTA DI PANE

1. Sciogliere 1 g di lievito disidratato in 50 ml di acqua.
2. Lasciare reidratare il lievito, poi aggiungere 75 g di farina.
3. Mescolare bene.

1. Porre la pasta in un cilindro graduato.
2. Segnare il volume della pasta ad intervalli di 10 minuti.

Domande
Fino a che punto il volume della pasta rispecchia la crescita del lievito? Come puoi provare le tue ipotesi?

Quali altri fattori (a parte l'attività del lievito) possono influire sulla lievitazione?

Cellule di lievito immobilizzate

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Il tradizionale lievito dei fornai, *Saccharomyces cerevisiae*, non è in grado di fermentare il lattosio. L'enzima β -galattosidasi scompone il lattosio in glucosio e galattosio. Il lievito, immobilizzato insieme a questo enzima, è in grado di crescere in un terreno di coltura che contiene lattosio. Dei due zuccheri formati dall'azione dell'enzima, si usa preferibilmente il glucosio. Una volta che l'approvvigionamento di questo zucchero si è esaurito, il lievito modifica il suo metabolismo e utilizza l'altro prodotto decomposto del lattosio cioè il galattosio. L'attività del lievito è facilmente monitorata misurando semplicemente il volume del gas (anidride carbonica) sviluppato durante la fermentazione.

Scopo del lavoro

Fornire un'introduzione allo studio quantitativo della fermentazione

Preparazione

L'alginato di sodio non è facilmente solubile in acqua; per scioglierlo c'è bisogno di acqua calda e agitazione, pertanto l'alginato di sodio deve essere preparato prima di iniziare l'esperimento. Se si vuole conservare l'alginato di sodio si consiglia prima di tutto di sterilizzare la soluzione in autoclave. *Nota bene: usare acqua distillata o deionizzata per tutte le soluzioni, in quanto gli ioni calcio in acqua di rubinetto possono causare le precipitazioni dell'alginato.*

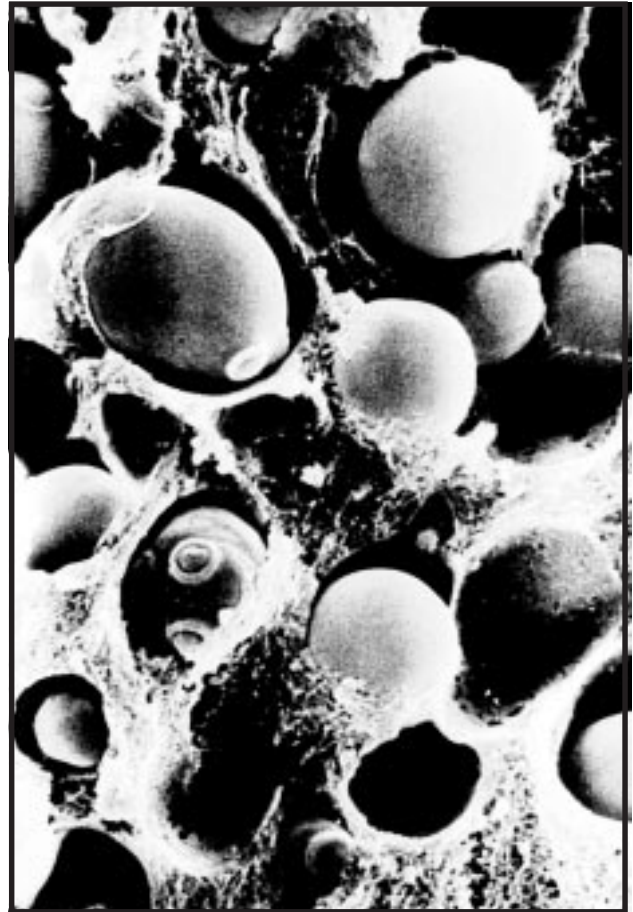
Tempo di preparazione

Le cellule di lievito immobilizzate possono essere preparate in 10-15 minuti. La fermentazione richiede una settimana.

Strumenti e materiali

Occorrenti ad ogni studente o gruppo di studenti

- 10-15 ml di alginato di sodio, in soluzione al 4%
- 100 ml di cloruro di calcio, in soluzione all'1,5%
- siringa da 10 ml, senza ago
- colino per il tè
- 2 beakers da 200ml
- 2 fiasche coniche da 250ml



Photograph courtesy Dr Duncan Casson

Cellule di lievito immobilizzare in una matrice di alginato di calcio

- 2 tappi adatti per le fiasche in fermentazione bucati e adattati con tubetti d'erogazione
- 2 beakers larghi da 500ml
- 2 cilindri graduati da 100ml
- soluzione chimica sterilizzante, per esempio, metabisolfato di sodio al 13% o un prodotto brevettato come Milton (ipoclorito di sodio, Procter&Gamble)
- 1l circa di cloruro di sodio (per questo lavoro è adatto il tradizionale sale da cucina)
- 100ml di terreno di coltura contenente 2g di glucosio, 1g di estratto di lievito e 1g di peptone
- 2ml di enzima β -galattosidasi come il Lactozym (Novo Nordisk),
- lievito dei fornai, fresco o secco

Procedimento

Preparare l'enzima immobilizzato e le particelle di lievito come segue:

1. Mescolare in un piccolo beaker il lievito secco con 25 ml di acqua distillata. Coprire e lasciare reidrattare per 10 minuti a temperatura ambiente.

- Mescolare in un altro piccolo beaker l'alginato di sodio e l'enzima β -galattosidasi. Aggiungere 10 ml della sospensione di lievito e mescolare.
- Prelevare con una siringa un po' della mistura di lievito/enzima/alginato. Aggiungerla, una goccia alla volta, al cloruro di calcio nel secondo beaker largo.
- Lasciare che i granuli di enzima/cellula di lievito immobilizzato si induriscano per 10 minuti nel cloruro di calcio.
- Separare i granuli dalla soluzione usando il colino da tè. Risciacquare bene con acqua del rubinetto.

I granuli possono essere conservati in frigorifero (5 °C) in acqua sterile per 3 giorni prima di essere utilizzati..

Predisporre i recipienti della fermentazione come segue:

- Sterilizzare le fiasche usando metabisolfato di sodio. Risciacquare le fiasche con acqua una volta finita la sterilizzazione
- Aggiungere i terreni di coltura sterili nelle fiasche. Usare il terreno di glucosio per uno (come controllo) e di lattosio per l'altro
- Aggiungere in ogni fiasca un numero uguale o un volume uguale di particelle di granuli di lievito immobilizzato

- Chiudere le fiasche con i tappi adattati con i tubetti d'erogazione
- Conservare le fiasche a 21°-25°C di temperatura. Raccogliere il gas prodotto attraverso il cloruro di sodio al 13% (in questa soluzione l'anidride carbonica non si dissolve). Registrare ad intervalli regolari il volume del gas che è stato raccolto
- Trascrivere i risultati su un grafico, evidenziando il volume di gas sviluppato nel tempo.

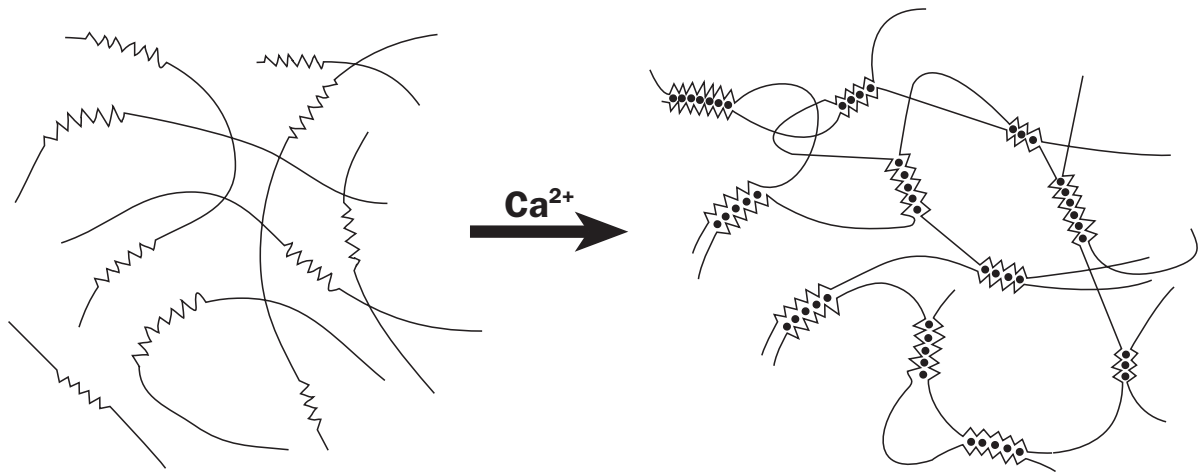
Ulteriori applicazioni

Possono essere utilizzati diversi tipi di lievito, lievito per fare il vino o dei fornai.

La concentrazione di β -galattosidasi, la temperatura di incubazione e altre variabili possono essere alterati.

Norme di sicurezza

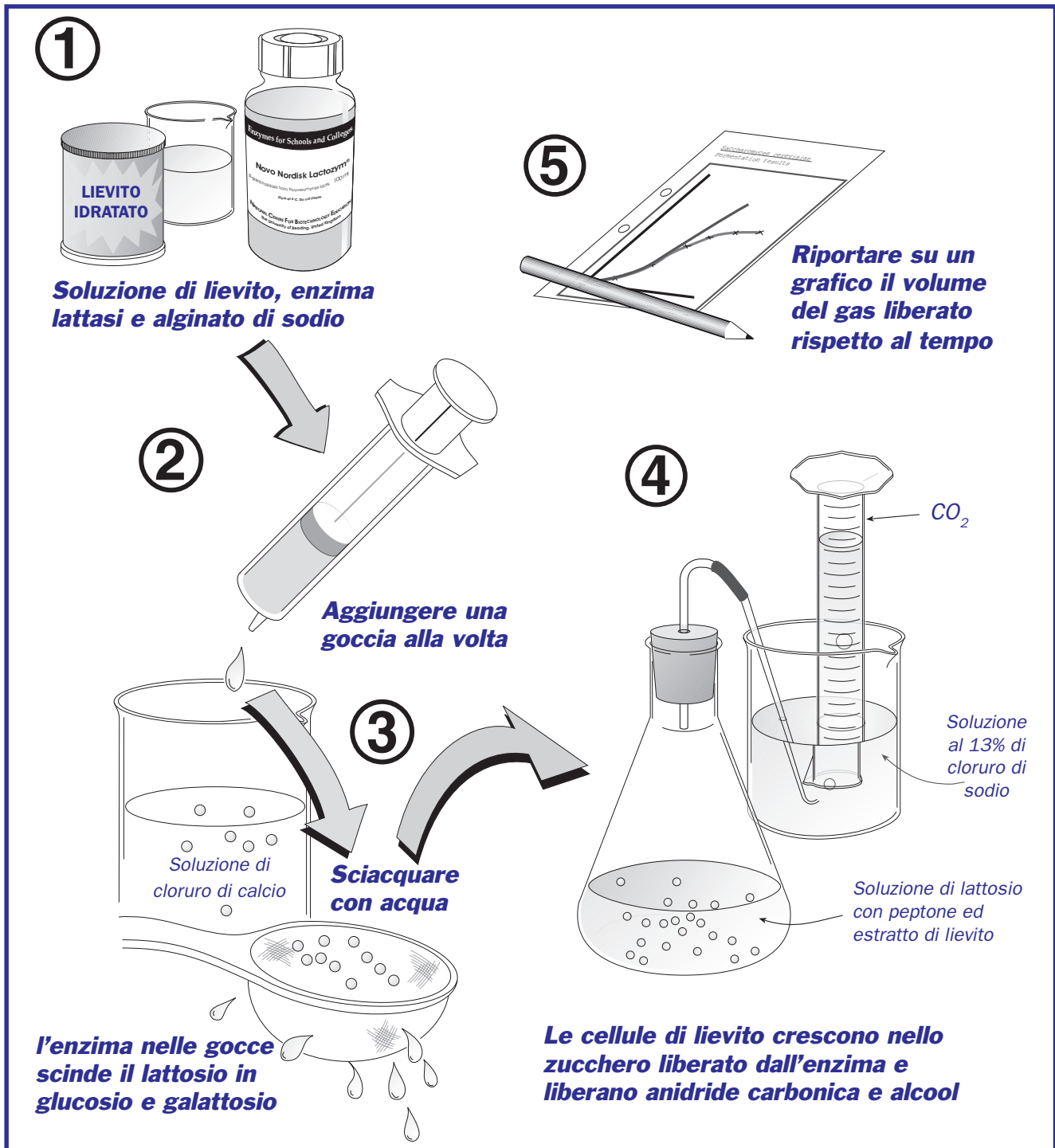
La produzione di gas in contenitori di vetro potrebbe essere pericolosa. Assicurarsi che i recipienti per la fermentazione abbiano un'apertura adeguata. Fare attenzione quando si usano agenti chimici sterilizzanti e seguire scrupolosamente tutte le indicazioni eventualmente fornite dalla ditta fornitrice.



La tecnica più usata per immobilizzare le cellule è l'intrappolamento nell'alginato di calcio. E' adatto soprattutto per le cellule viventi poiché richiede condizioni molto blande. Le applicazioni di questo metodo versatile includono l'immobilizzazione di cellule vive o morte in bioreattori, intrappolamento di protoplasti della pianta e embrioni ("semi artificiali") per micropropagazione, immobilizzazione di cellule di ibridoma per la produzione di anticorpi monoclonali e l'intrappolamento di enzimi e farmaci (vedi tabella). Le cellule o gli enzimi che devono essere

intrappolati sono prima mischiati con una soluzione di alginato di sodio. Questa poi è versata, una goccia alla volta, in una soluzione che contiene cationi multivalenti (Ca^{2+}). Le goccioline, cadendo, automaticamente formano delle sfere intrappolando le cellule in un reticolo tridimensionale di alginato stabilizzato da legami ionici crociati.

Per ulteriori informazioni vedi Smidsrod, O. e Skjak-Braek, G. (1990) Alginate as an immobilization matrix for cellules. *Trends in Biotechnology* 8 (3) 71-79.



Esempi per l'uso di cellule immobilizzate-alginato (secondo Smidsrod, O. e Skjak-Braek, G. (1990))

Cellule

Batteri

Erwinia rhabpontice
Pseudomonas denitrificans
Zymomonas mobilis

Cianobatteri

Anabena sp.

Funghi

Kluyveromyces fragilis
Saccharomyces cerevisiae
Saccharomyces bayanus

Alghie

Botryococcus braunii

Prodotto

Isomaltulosio
Potabilizzazione dell'acqua
Alcool

Ammoniaca

Idrolisi del lattosio
Alcool
Produzione di Champagne

Idrocarburi

Cellule

Cellule vegetali

Chatharanthus roseus

Piante varie
Protoplasti

Cellule di mammifero

Ibridomi
Isole di Langerhans
Fibroblasti o linfoma

Prodotto

Alcaloidi per la terapia contro il cancro
Semi artificiali
Manipolazione cellulare, microscopia

Anticorpi monoclonali
Insulina/Impianto
Interferoni (α e β)

La pila a combustibile microbico



Per decenni, i microrganismi che producevano elettricità sono stati una curiosità biologica. Oggi i ricercatori prevedono un loro utilizzo negli orologi e nelle telecamere, come fonte di energia per il Terzo Mondo e per i bioreattori per trasformare i rifiuti industriali in elettricità.

La pila a combustibile microbica qui descritta genera una piccola corrente elettrica deviando gli elettroni dalla catena di trasporto degli elettroni del lievito. Può essere utilizzato per studiare la respirazione in un modo nuovo e più stimolante. Si possono trovare ulteriori informazioni in *BIO/technology Education*, Volume 1, Numero 4, pp. 163-168.

Scopo del lavoro

- Fornire un'introduzione stimolante allo studio della respirazione.
- Permettere lo studio di alcuni fattori che influenzano la respirazione microbica.
- Mostrare come il materiale organico di scarto può essere utilizzato per generare elettricità.

Preparazione

Le soluzioni di reagenti dovrebbero essere preparate prima di incominciare l'esperimento. Prima di tutto immergere la membrana di scambio dei cationi in acqua distillata per 24 ore prima dell'uso. Il lievito secco può riprendere la sua attività mentre la pila a combustibile viene "montata" (assemblata).

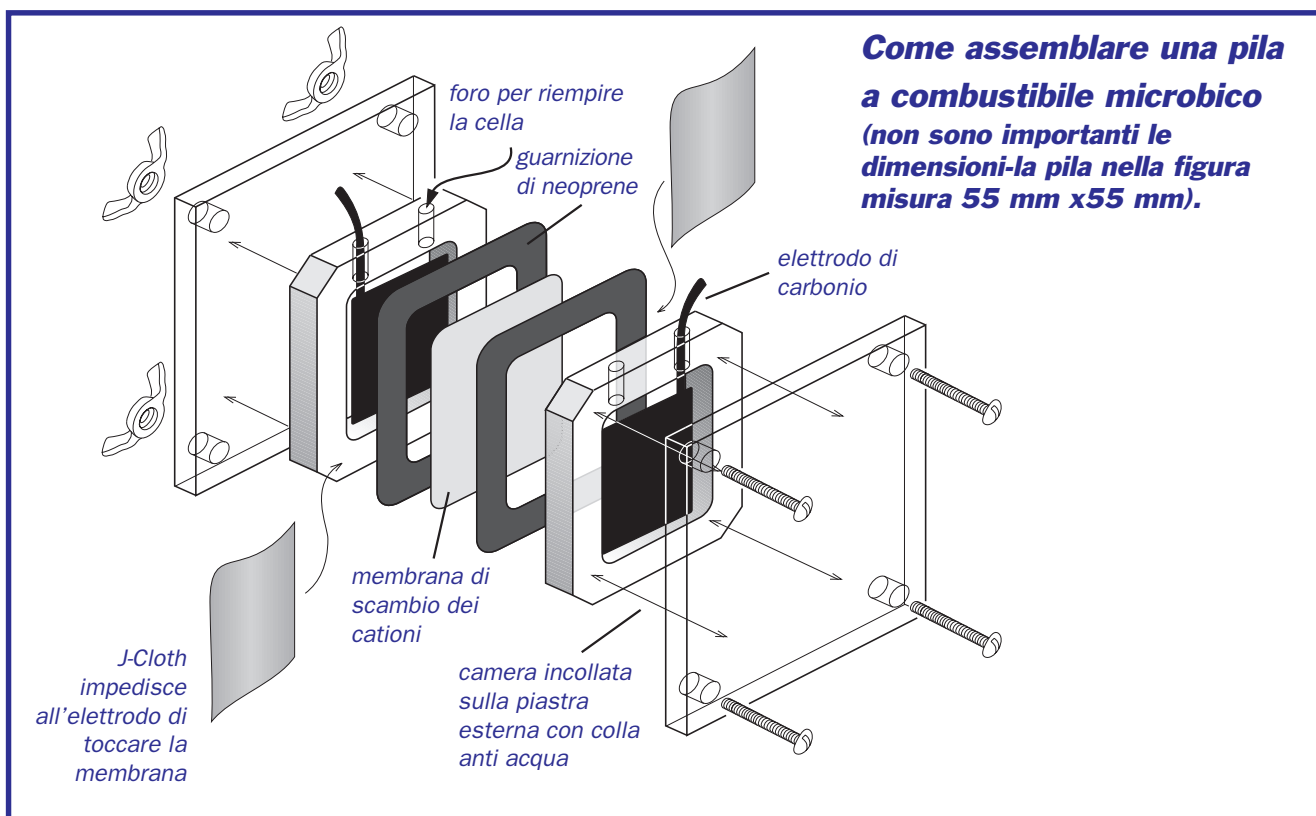
Tempo di preparazione

L'assemblaggio (fino alla generazione di elettricità) richiede 30 minuti.

Strumenti e materiali

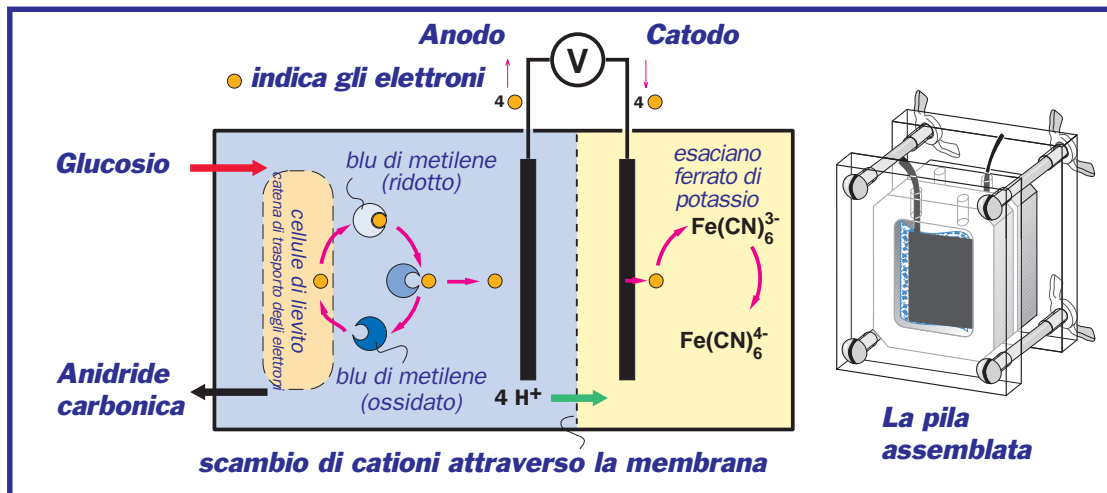
Occorrenti ad ogni studente o gruppo di studenti

- Pila a combustibile Perspex (ICI) tagliata dello spessore di 4 mm
- 2 guarnizioni di Neoprene
- membrana di scambio dei cationi, in modo che si adatti tra le camere della pila a combustibile. La membrana può essere riutilizzata, ma se è autoclavata, si fonde
- 2 elettrodi di carbonio, di misura adatta
- 2 pezzi di J-Cloth (Johnson&Johnson) per separare l'elettrodo dalla membrana
- 2 siringhe di plastica da 10 ml, per distribuire i liquidi
- Piastra Petri sulla quale mettere la pila a combustibile
- 2 derivazioni elettriche con morsetti coccodrillo



Come assemblare una pila a combustibile microbico (non sono importanti le dimensioni-la pila nella figura misura 55 mm x55 mm).

Come funziona la pila



- 0-5 V voltmetro o multimetro e/o motore a bassa corrente
- Forbici

Tutte le soluzioni elencate qui di seguito devono essere preparate in un tampone fosfato 0,1M, a pH 7,0 e non in acqua.

- Lievito secco preparato in una sospensione spessa in un tampone fosfato 0,1 M (non aggiungere il glucosio senza prima aver risospeso il lievito nel tampone)
- blu di metilene 5ml di 10 mM
- glucosio 5ml di 1 M
- esaciano ferrato di potassio (III) 10 ml di 0,02 M (detto anche ferrocianide di potassio).

Per fare un tampone fosfato 0,1 M a pH 7.0

Sciogliere 4.08 g Na_2HPO_4 e 3,29 g di NaH_2PO_4 in 500 ml di acqua distillata

Procedimento

1. Tagliare due elettrodi di carbonio descritto nella foto.
2. Tagliare 2 pezzi di J-Cloth che si adattino nella pila combustibile.
3. Assemblare la pila combustibile come indicato nella figura.
4. Come base di appoggio utilizzare una piastra Petri o ascuigare prontamente l'eventuale liquido fuoriuscito.
5. Unire la sospensione di lievito, il glucosio e il blu di metilene. Iniettare la mistura in una camera della pila combustibile.
6. Iniettare l'esaciano ferrato di potassio in un'altra parte della pila.
7. Collegare un voltmetro o multimetro (attraverso i morsetti) alle terminazioni dell'elettrodo. Le pile a combustibile di questi tipo generano tipicamente tra 0,4 - 0,6 V. La

corrente dovrebbe essere prodotta immediatamente - se il misuratore registra zero, controllare le connessioni e assicurarsi che gli elettrodi di carbonio non tocchino la membrana di scambio dei cationi.

Ulteriori applicazioni

1. Numerose pile a combustibile possono essere unite per dare origine ad un più alto voltaggio. Aumentando la dimensione della pila (o l'area dell'elettrodo) aumenta la corrente generata (ma non il voltaggio).
2. Possono essere utilizzati diversi mediatori e/o tipi di lievito, come il lievito dei fornai o lievito per produrre il vino possono essere utilizzati. *Nota bene: per ragioni di sicurezza, si sconsiglia l'utilizzo di questa pila a combustibile con altri microrganismi.*
3. Studiare l'effetto della temperatura sull'azione della pila a combustibile (ricorda di considerare quali controlli sono necessari quando fai paragoni di questo tipo).

Norme di sicurezza



L'esaciano ferrato di potassio è velenoso. Indossare una protezione per gli occhi quando si maneggia questo materiale. Se questa soluzione viene a contatto con gli occhi, bagnarli con acqua e farsi vedere dal medico. Se si bevessero accidentalmente, bere molta acqua e riferire al medico. Osserva le disposizioni di legge previste per ogni paese dell'U.E.

Ringraziamenti

La pila carburante microbica fu sviluppata da Peter Benneto al King's College di Londra.

Naturale trasferimento genetico per coniugazione batterica



In natura esistono diversi metodi con i quali è possibile che dei geni vengano trasferiti da un batterio ad un altro. Questi meccanismi probabilmente si sono evoluti per permettere agli organismi di adattarsi ai rapidi cambiamenti delle condizioni ambientali. Di norma, i geni che più facilmente vengono trasferiti sono localizzati sui plasmidi.

I plasmidi sono forme circolari di DNA che si replicano indipendentemente dal cromosoma batterico. Essi comprendono un numero ridotto

di geni in grado di conferire ai loro possessori capacità, quali l'abilità di difendersi da sostanze dannose presenti nell'ambiente, come metalli pesanti o antibiotici.

Si conoscono tre tipi di trasferimento genico naturale:

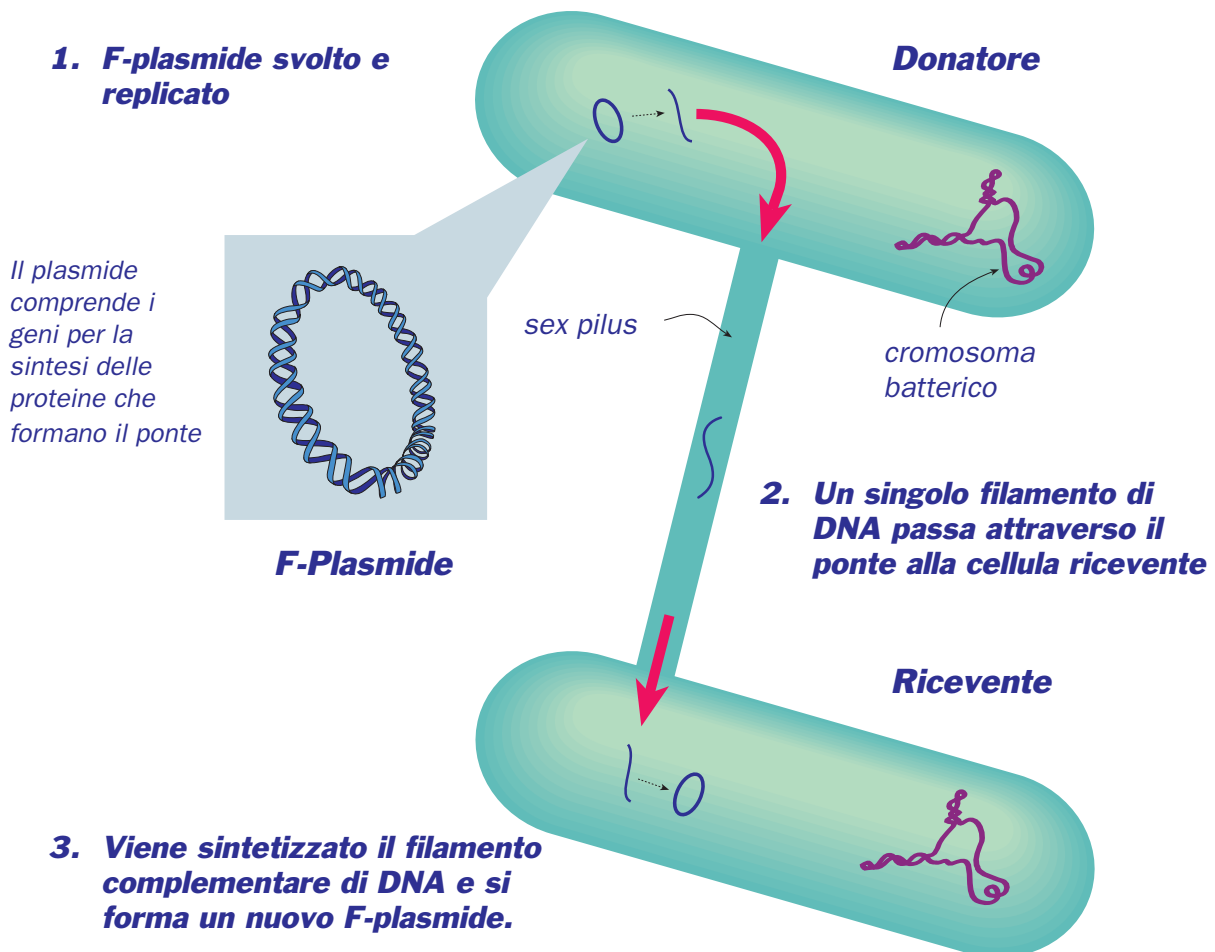
Trasformazione: è l'assunzione di DNA libero da cellule circostanti;

Trasduzione: è lo spostamento di DNA da una cellula ad un'altra tramite l'intervento di un batteriofago;

Coniugazione: è il trasferimento di particolari "F-plasmidi" attraverso un sottile ponte (sex pilus) che collega due cellule batteriche. (vd. figura 1).

Tutti questi processi (soprattutto la trasformazione) sono impiegati in ingegneria genetica per trasferire geni selezionati nei batteri.

Figura 1. Coniugazione e trasferimento di un F-plasmide tra due cellule batteriche



Nell'esperimento che segue viene esaminato un processo di coniugazione che avviene in natura tra ceppi batterici.

Nota: questo lavoro tratta processi, batteri e plasmidi che esistono normalmente in natura e non tratta, perciò, di "ingegneria genetica".

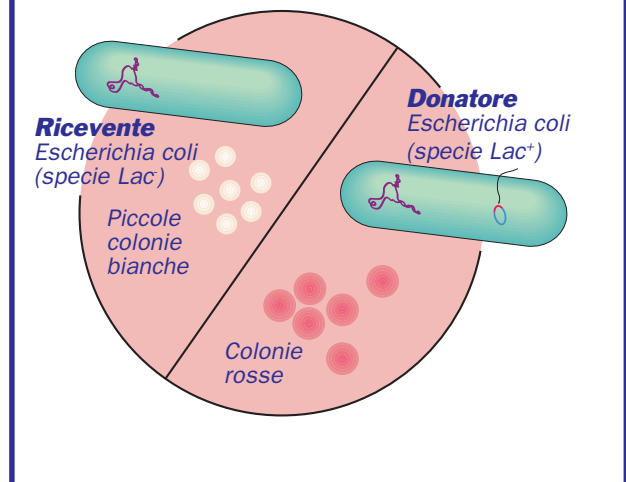
F- plasmidi

I cosiddetti F-plasmidi (F sta per fertilità) comprendono geni che permettono il trasferimento di una copia del plasmide da una cellula donatrice ad una ricevente (in altre parole, coniugazione batterica).

Gli F-plasmidi possono comprendere anche altri geni. Per esempio, nell'esperimento qui descritto, il batterio donatore cede un plasmide chiamato F-Lac. Quest'ultimo è così chiamato perché comprende i geni che permettono al batterio ospite di metabolizzare il lattosio (il batterio viene perciò chiamato specie *Lac*⁺). Al contrario il batterio ricevente, privo del plasmide, è incapace di metabolizzare il lattosio (esso appartiene alla specie *Lac*⁻).

Su piastre con agar MacConkey queste specie differenti si possono distinguere nel loro aspetto : la specie donatrice origina colonie

Figura 2. La comparsa di specie donatrici e riceventi su comune agar MacConkey



rosse, mentre la specie ricevente sviluppa colonie bianche (vd. figura 2).

Quando il donatore ed il ricevente vengono mescolati, i plasmidi F-Lac vengono trasferiti dal donatore al ricevente. In questo modo il ricevente acquista la capacità di metabolizzare il lattosio.

Uno "stratagemma" genetico permette di

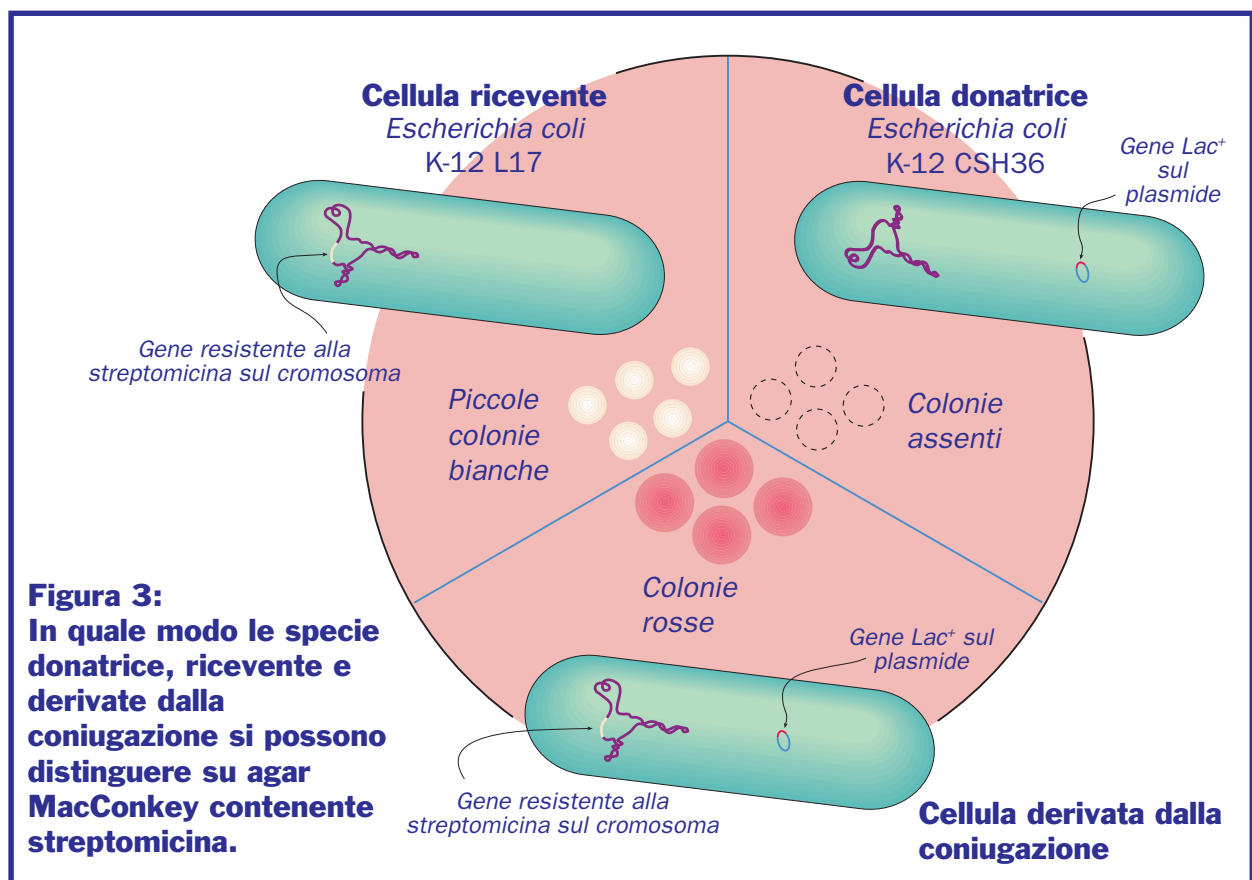


Figura 3:
In quale modo le specie donatrice, ricevente e derivate dalla coniugazione si possono distinguere su agar MacConkey contenente streptomicina.

distinguere specie donatrici, riceventi e quelle derivate dalla coniugazione. Si sceglie una specie ricevente che ha un gene cromosomico che la rende immune all'antibiotico streptomina. La specie donatrice non possiede tale gene e la sua crescita viene inibita dalla streptomina. In questo modo si possono individuare le specie riceventi e derivate dalla coniugazione che conservano la capacità di crescere su un terreno di coltura contenente streptomina (vd. figura 3).

Scopo del lavoro

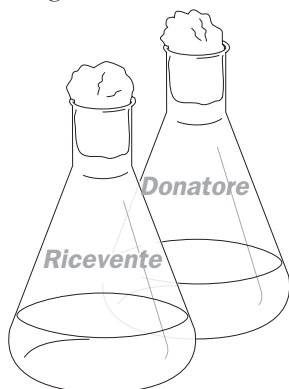
- Fornire un'introduzione stimolante alla genetica batterica.
- Dare agli studenti l'occasione di discutere su argomenti associati al trasferimento genetico naturale; per esempio, l'espansione della resistenza agli antibiotici e la valutazione dei pericoli nella tecnologia genetica.

Preparazione

Occorre preparare e sterilizzare i seguenti terreni di coltura:

- 3 piccole (es. 100 ml) beute (fiaschi conici), ciascuna contenente 10 ml di brodo nutriente sterile;
- Agar MacConkey sterile contenente streptomina solfato (200 mg per ml). Dopo aver portato l'agar ad una temperatura di 50 °C, distribuirlo ancora caldo in piastre Petri sterili (versare 15-20 ml a piastra).
- Le colture utilizzate sono:
 - la specie donatrice:
Escherichia coli K-12 CSH36 (DSM Numero 6253)
 - la specie ricevente:
Escherichia coli K-12L17 (DSM Numero 6254).

Queste specie presenti in natura provengono dalla German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM). Entrambe le colture vengono fornite disidratate e congelate, in



ampolle di vetro. Le ampolle devono essere aperte in modo corretto; bisogna far attenzione a non contaminare il contenuto e che l'uso non esponga ad inutili pericoli (vd. istruzioni allegate). La specie donatrice si mantiene con difficoltà sul terreno sul quale viene spedita, perciò è necessario ricostituirla al più presto.

Entrambe le colture lasciate ad incubare la notte devono essere preparate nel modo seguente:

1. Inoculare una beuta contenente brodo nutriente sterile con la specie donatrice (scrivere sulla beuta Donatore), e l'altra con la ricevente (scrivere sulla beuta Ricevente);
2. Incubare le beute la notte a 37 °C, possibilmente in bagno termostato.

La preparazione della miscela di queste due colture si esegue nel modo seguente:

1. Con una pipetta sterile, in ambiente asettico, porre 0.8 ml della specie donatrice nella terza beuta, contenente 10 ml di brodo nutriente sterile.
2. Con un'altra pipetta sterile, sempre in ambiente asettico, aggiungere 0.2 ml della specie ricevente nella stessa beuta.
3. Scrivere sulla beuta cosa contiene ed incubarla a 30 °C per 16-24 ore
Nota: Durante l'incubazione agitare le beute solo molto lentamente - una forte agitazione potrebbe spezzare i ponti che legano le cellule coniugate.

I bastoncini in ovatta sterile si preparano avvolgendo una piccola quantità di ovatta intorno alla punta di una bacchetta da cocktail. Autoclavarli in una bottiglia McCartney o in un foglio di alluminio a 121 °C per 15 minuti.

Tempo di preparazione

Preparazione dei terreni:	60 minuti
Incubazione iniziale:	48 ore
Inoculazione delle piastre:	15 minuti
Incubazione:	24 ore
Analisi dei risultati:	20 minuti

Attrezzatura e materiali

Occorrenti per ogni studente o gruppo di studenti (Si suppone che anche l'attrezzatura di un normale laboratorio sia idonea)

- Incubatore, settato a 30 °C
- Piastre Petri sterili, contenenti 15-20 ml di agar MacConkey, con aggiunta di Streptomina

- Le colture seguenti fatte crescere precedentemente su brodo nutriente:
 - *Specie donatrice*
 - *Specie ricevente*
 - *Miscela delle specie donatrice e ricevente*
- Tre bastoncini di ovatta sterile preparati da voi
- Piccoli beaker contenenti una soluzione disinfettante, es. soluzione al 3% di Domestos (Lever), nei quali porre i bastoncini usati
- Pennarello (per scrivere sulle piastre Petri)

Procedimento

1. Sulla base di una delle piastre di Streptomicina/agar MacConkey, partendo dal centro, segnare tre linee in modo da individuare tre zone di ugual grandezza.
2. Al centro di ogni zona, disegnare un cerchio di circa 10 mm di diametro. In un cerchio segnare la lettera D (per specie Donatrice), in un altro la lettera R (per specie Ricevente) e in un altro la lettera M (per Miscela delle due specie - forme derivanti dalla coniugazione).
3. Utilizzando i bastoncini di ovatta sterile inoculare ogni zona marcata con la rispettiva specie batterica. Ricordarsi di usare un nuovo bastoncino per ogni coltura. Mettere i bastoncini usati nel disinfettante.
4. Lasciare le piastre dritte per pochi minuti, in modo che il liquido non si diffonda

troppo sulla superficie del terreno d'agar (causando il mescolamento delle colture poste nelle zone segnate). Incubare le piastre, capovolte, uno o due giorni a 30 °C.

Ulteriori applicazioni

Questo esperimento può essere modificato in una grande quantità di versioni, per esempio:

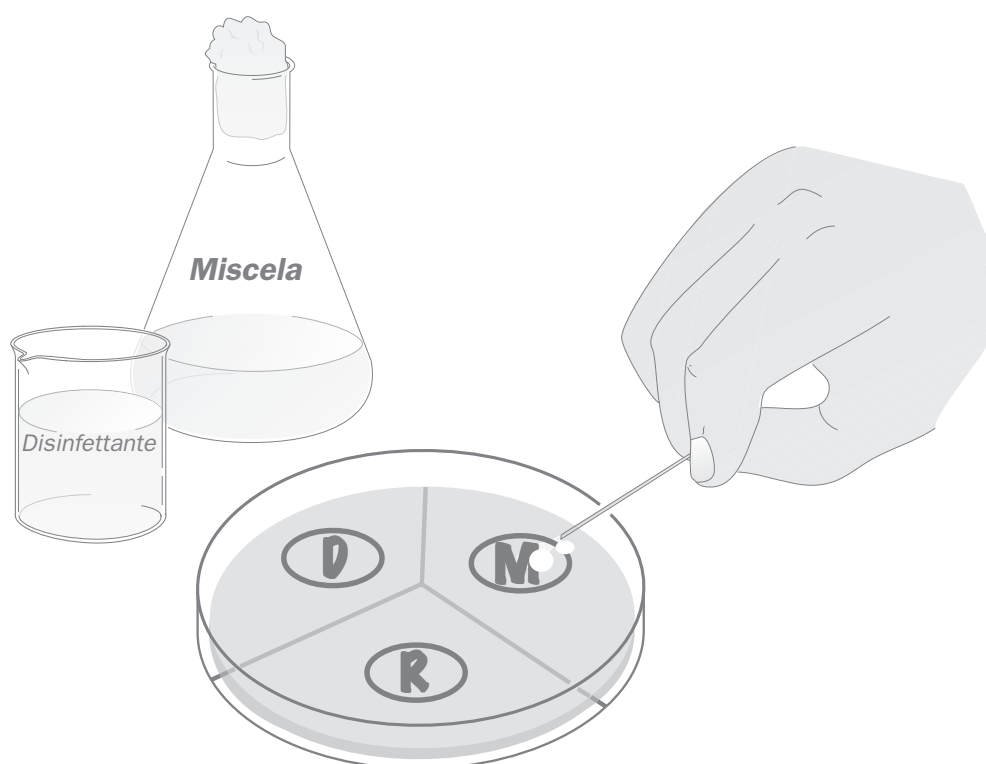
1. Diluendo le colture donatrici e riceventi in una soluzione fisiologica sterile o con una soluzione di 10^{-3} di $MgSO_4$, è possibile fare un'ottima stima della presenza di specie donatrice o ricevente.
2. Si può determinare il tempo ottimale per il processo di coniugazione.

Misure di sicurezza

Questo lavoro deve essere svolto in laboratorio. Quando si svolge questo lavoro e si manipolano colture batteriche, occorre seguire le misure di sicurezza standard microbiologiche, incluse le tecniche di asetticità.

Ringraziamenti

Questa è una versione semplificata dell'esperimento ideato dalla Prof.ssa Patricia Nevers dell'Università di Amburgo. A sua volta il metodo della Prof.ssa Nevers si basa su quello di E. Harle e R. Hausmann dell'Università di Freiburg.



Transferimento genico naturale con *Agrobacterium tumefaciens*



I tumori delle piante costituiscono un grave danno per l'agricoltura, l'orticoltura e la viticoltura. Spesso si sviluppano quando sulle piante si manifestano minuscole ferite dovute alla lavorazione del terreno, a seguito di danni dovuti al gelo o nel corso di un innesto.

A inizio secolo si era osservato che certi tumori erano sempre associati con infezioni batteriche. I batteri coinvolti erano chiamati *Agrobacterium tumefaciens* (dal latino: agar = terra; tumour = accrescere; facere = fare). Solo verso la fine degli anni '70 finalmente si è fatta luce sulle complesse correlazioni tra piante ed *Agrobacterium*.

Il batterio infettivo introduce una piccola parte del suo patrimonio genetico (un plasmide) nel genoma delle cellule della pianta, obbligando le cellule infettate a seguire un programma favorevole al batterio. Quest'ultimo, infatti, induce ogni cellula della pianta infettata a dividersi. Si sviluppa un tumore che diventa l'habitat per il batterio e gli procura derivati aminoacidi che sono necessari per l'indesiderato ospite.

I metodi di trasferimento genico usati dall'*Agrobacterium* sono stati adottati ed usati dai coltivatori per trasferire nelle cellule delle piante geni specifici evitando di perdere tempo con la tecnica degli incroci. Di conseguenza, forme modificate di *Agrobacterium* sono diventate un importante mezzo di tecnologia genetica.

L'*Agrobacterium* ha la forma di bastoncino ed ha circa le stesse dimensioni dell'*E. coli*; da 1 a 3 micrometri di lunghezza.

L'*Agrobacterium tumefaciens* conserva la sua virulenza nel terreno, dove esso vive aerobicamente occupando gli strati superiori. E' un saprofito, benché possa utilizzare azoto inorganico. L'*Agrobacterium* invade solo piante dicotiledoni e può penetrare ed infettare le piante solo passando attraverso ferite superficiali, in quanto il batterio è incapace di penetrare le pareti cellulari di piante integre. La linfa di cellule danneggiate è di "richiamo"

per gli altri batteri ed innesca il trasferimento genico. Essi si moltiplicano nell'area intorno alla ferita e penetrano nello spazio intercellulare, legandosi alla parete delle cellule della pianta.

Il plasmide dell'*Agrobacterium* viene trasferito ed eventualmente integrato in un cromosoma nella stessa pianta, da dove esso controlla la produzione di opine, che l'*Agrobacterium* utilizza come risorsa di carbonio ed azoto.

Scopo del lavoro

Nella seguente indagine il *Bryophyllum - Kalanchoe* sp. (che è sia di facile crescita che propagazione) viene infettato in diversi modi con la forma di *Agrobacterium* presente in natura. Entro 4 settimane, è possibile osservare la crescita di un tumore. Nell'eseguire l'esperimento si possono applicare e studiare le seguenti varianti:

A. Metodo di infezione

- praticare una spellatura ed infettare immediatamente con l'*Agrobacterium*;
- praticare una spellatura ed apporvi l'*Agrobacterium* il giorno seguente;
- praticare una spellatura ed infettare con l'*Agrobacterium*. Coprire con un pezzo di carta umida;
- applicare l'*Agrobacterium* su una zona della pianta integra.

B. Punto di infezione

- fusto;
- superficie fogliare;
- apice del germoglio.

Preparazioni antecedenti l'esperimento

1. Propagazione di una gran quantità di piante (possono farlo gli studenti - se è possibile a casa);
2. Preparazione di un terreno nutriente e di colture di *Agrobacterium tumefaciens*. Le nuove colture devono essere preparate almeno due settimane prima di essere utilizzate.

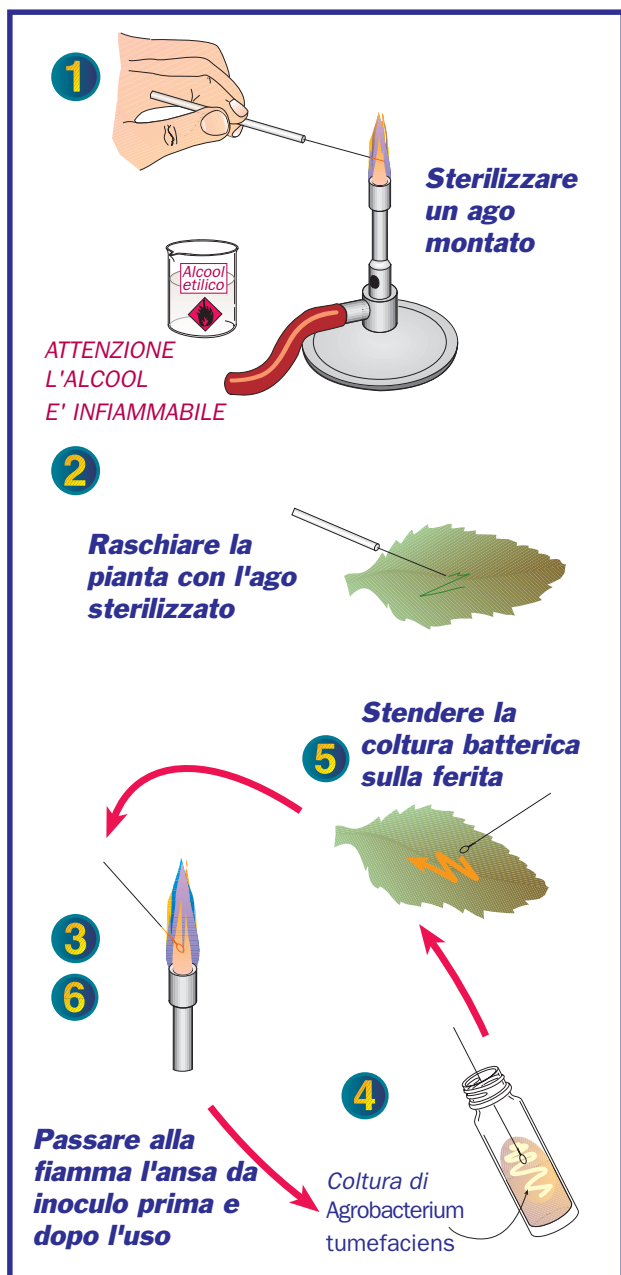
Tempo di preparazione

Crescita delle numerose piante (se è necessario):	4 mesi
Preparazione della coltura di <i>Agrobacterium</i> :	2 settimane
Infezione delle piante con l' <i>Agrobacterium</i> :	20 minuti
Osservazione dello sviluppo del tumore:	3 o 4 settimane.

Attrezzatura e materiale

Occorrente per ogni studente o gruppo di studenti.
(Si suppone che anche l'attrezzatura di un normale laboratorio sia idonea)

- Acqua sterile (pronta in contenitore McCartney)
- Ago da inoculo
- Ansa da inoculo
- Microscopio binoculare
- Forbici
- Etichette e pennarello
- Carta assorbente
- Nastro adesivo
- Alcool, per sterilizzare gli strumenti
- Coltura di *Agrobacterium tumefaciens* (cresciuta su agar)
- Piante di *Kalanchoe (Bryophyllum)*, di circa 3 o 4 mesi



Procedimento

Nell'esperimento le piante vengono trattate secondo diversi metodi (vd. le note introduttive soprascritte e le istruzioni seguenti).

1. Contrassegnare con un cartellino ogni pianta indicando la data e il tipo di trattamento che ha ricevuto. Se necessario, marcare la parte infettata delle piante per es. con delle etichette.
2. Dopo il trattamento, porre le piante in luogo ben illuminato e mantenerle umide (ma non innaffiare troppo!)
3. Osservare ed annotare lo sviluppo dei tumori nel periodo che intercorre tra la 4^o e la 6^o settimana. Esaminare un frammento di tessuto tumorale accresciuto su una foglia al microscopio binoculare e paragonarlo a del tessuto di una foglia normale.

Come infettare le piante con *Agrobacterium*

Metodo n° 1 (Le ferite vengono infettate immediatamente)

1. Dopo aver immerso un ago da inoculo nell'alcool passarlo alla fiamma e lasciar esaurire l'alcool. Raschiare la superficie della pianta una o più volte.
2. Infettare la ferita con l'*Agrobacterium* prelevato dalla coltura. Per fare ciò, passare sulla fiamma un'ansa da inoculo e lasciarla raffreddare per poco tempo. Prelevare una piccola parte dalla coltura batterica di colore biancastro servendosi dell'ansa e stenderla sulla ferita. Sterilizzare nuovamente l'ansa.

Metodo n° 2 (Le piante vengono infettate 24 ore dopo avervi provocato spellature)

1. Praticare graffiature sulle piante (come nel Metodo n°1)
2. Il giorno successivo stendere sull'area raschiata l'*Agrobacterium*.

Metodo n° 3 (Le spellature vengono infettate e poi coperte con carta inumidita)

1. Raschiare ed infettare la pianta come descritto sopra (Metodo n° 1).
2. Ritagliare strisce di carta con le forbici ed inumidirle con l'acqua sterile. Mettere le strisce sulla spellatura e fissarle con nastro adesivo. Mantenere la carta umida per due giorni.

Metodo n° 4 (*Le piante non vengono infettate*)

1. Eseguire delle spellature negli stessi punti del Metodo n° 1 e ricoprire una delle spellature con carta umida. Non trattare le piante con l'*Agrobacterium*.

Metodo n° 5 (*Viene effettuata l'infezione senza spellare la pianta*)

1. Non provocare spellature sulla pianta
2. Usare un'ansa metallica per applicare asetticamente l'*Agrobacterium* su una o più parti della superficie integra.

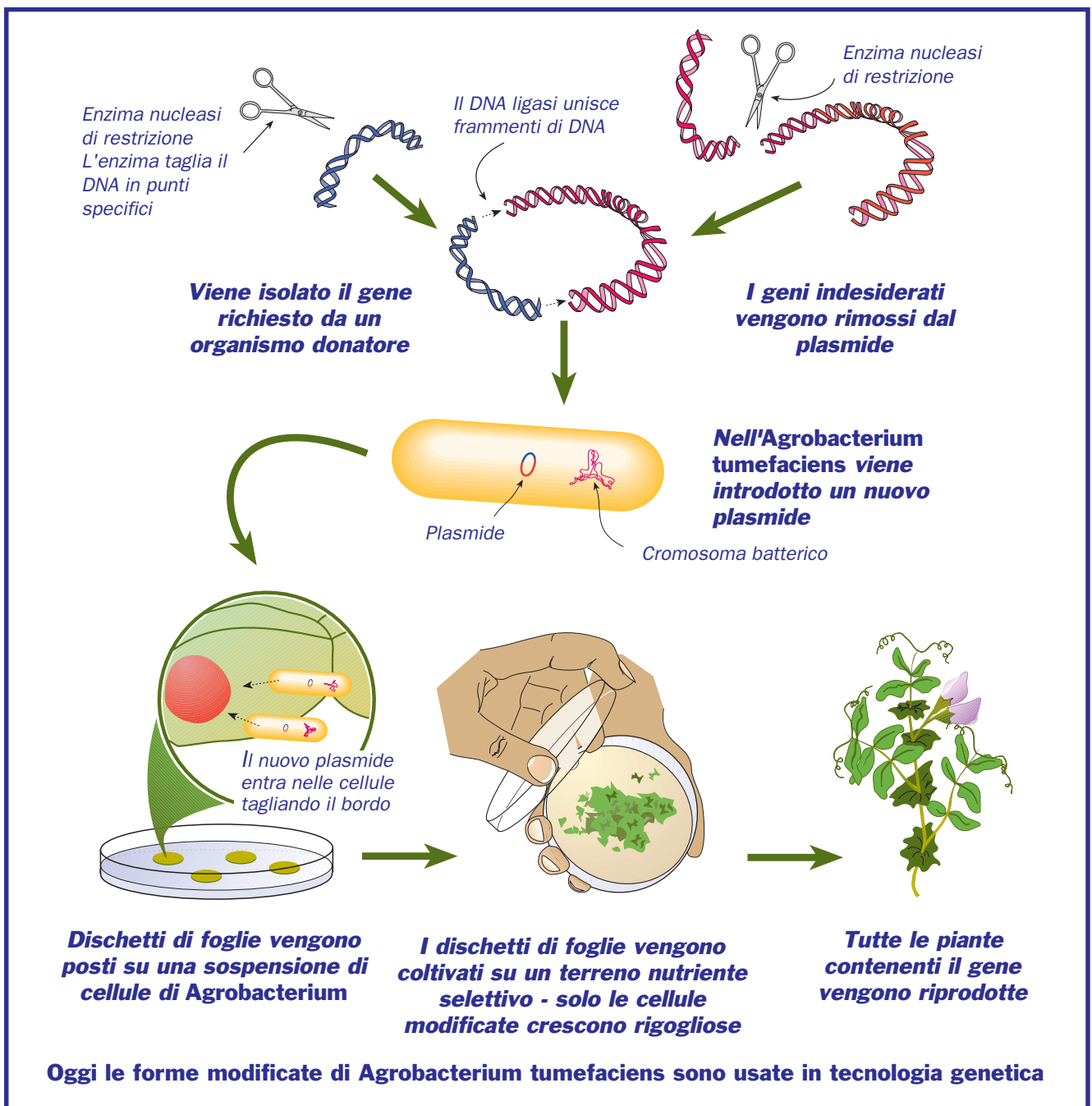
Avvertenze

Questo esperimento deve essere svolto in laboratorio. Quando si manipolano colture batteriche bisogna seguire le norme di sicurezza microbiologiche standard, incluse le tecniche di sterilità.

IMPORTANTE: *A. tumefaciens* è un pericoloso patogeno per le piante. In alcuni paesi il suo impiego negli esperimenti è severamente controllato. Chi desidera eseguire questo lavoro deve assicurarsi di non trasgredire le leggi locali.

Ringraziamenti

Uta Nellen ha ideato questo esperimento al "Centre for School Biology and Environmental Education" in Amburgo. EIBE le è grata per aver permesso di utilizzare questo materiale.





Appendice 1

Terreni per colture batteriche

MODULO
1

European Initiative for Biotechnology Education

Il terreno di agar nutriente ed il brodo nutriente possono essere preparati con prodotti disponibili in commercio, seguendo le istruzioni dei prodotti. Essi devono essere autoclavati prima dell'uso per 15 minuti a 121 °C. I terreni preparati in genere si conservano, mantenendoli a 4 °C, per diversi mesi.

Terreno d'agar con amido

Agar nutriente	20.7 g
Amido, solubile	2.0 g

Sciogliere in un litro di acqua distillata e autoclavare per 15 minuti a 121°C.

Agar MacConkey con streptomicina

Agar MacConkey	50.0 g
Acqua distillata	990 ml

Dopo aver autoclavato per 15 minuti a 121°C, portare alla temperatura di 50 °C e aggiungere:

Soluzione di streptomicina solfato	200 mg/10 ml
------------------------------------	--------------

Queste placche devono essere preparate al momento dell'uso. Esse possono conservarsi non più di qualche giorno in frigo a circa 4 °C.



Appendice 2

Tecniche microbiologiche

MODULO

1

European Initiative for Biotechnology Education

Aerosols

Gli aerosols sono piccole gocce cariche di microrganismi che accidentalmente possono essere rilasciate nell'aria; esse persistono nell'aria mezz'ora, un'ora o più e possono essere inalate. Gli aerosols sono la principale fonte di contaminazione in laboratorio. Quelli derivanti da colture batteriche causano infezioni su pelle ed occhi. Se le colture vengono pipettate con le labbra è possibile che avvenga un'ingestione di microrganismi.

Regole generali di laboratorio

Bisogna adottare le seguenti precauzioni:

Non portare nulla alla bocca (es. gomma di matita, pennarelli, pipette). In laboratorio non si deve mangiare, bere o fumare.

E' importante che gli studenti indossino il camice da laboratorio. Ogni ferita o abrasione deve essere protetta con una fasciatura prima di iniziare l'attività di laboratorio.

I banchi di lavoro devono essere lavati con disinfettanti specifici prima e dopo ogni esperimento. I disinfettanti adatti si trovano presso fornitori di laboratori scientifici.

Dopo l'attività di laboratorio insegnanti, tecnici e studenti devono lavarsi le mani.

Incidenti di laboratorio

Gli incidenti di laboratorio in cui sono coinvolte colture devono essere risolti nel seguente modo: Indossare guanti monouso. Contenitori rotti o colture versate devono essere coperti con un panno imbevuto di disinfettante. Entro 10 minuti, occorre pulire ogni cosa usando panni di carta e una paletta. Il materiale contaminato deve essere riposto in uno specifico contenitore per rifiuti contaminati o in un recipiente che si può gettare. Bisogna autoclavare questo contenitore prima di gettarlo. Anche la paletta deve essere autoclavata o posta in disinfettante per 24 ore.

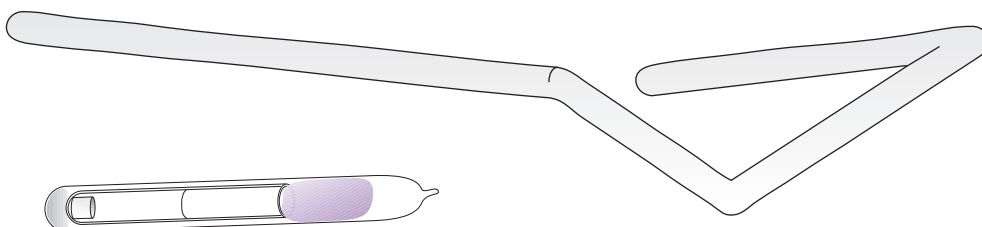
Accidentale contaminazione di pelle o vestiario

Appena è possibile ogni cosa che è stata macchiata deve essere lavata. Bisogna porre nel disinfettante i vestiti seriamente contaminati prima di lavarli.

I panni usati per pulire, che sono stati contaminati, devono essere autoclavati o immersi nel disinfettante.

Acquisto di microrganismi

Tutti i microrganismi devono essere considerati come un potenziale pericolo. Gli organismi utilizzati nell'attività di questo modulo comportano un rischio minimo se si ha una buona pratica. Essi devono essere acquistati presso fornitori abilitati.



Tecniche di asetticità



Le finalità di queste tecniche sono:

- Ottenere e mantenere pure le colture di microrganismi;
- Svolgere con sicurezza un lavoro che implica la manipolazione di microrganismi.

Una "coltura pura" contiene solo una specie di microrganismi, mentre una miscela di colture contiene due o più specie.

La contaminazione delle colture è una minaccia sempre presente perché i microbi si trovano dappertutto: sulla pelle, nell'aria e su soggetti inanimati. Per ottenere colture pure, bisogna usare attrezzature e terreni di coltura sterili e bisogna eliminare possibili fonti di contaminazione. Queste sono le regole fondamentali delle tecniche di asetticità.

Sarebbe poco realistico aspettarsi che dei giovani studenti seguano alla lettera le tecniche di asetticità. Tuttavia, in alcuni esperimenti di questo modulo, gli studenti devono svolgere trasferimenti di colture in modo asettico. In tal caso si devono adottare le misure indicate di seguito.

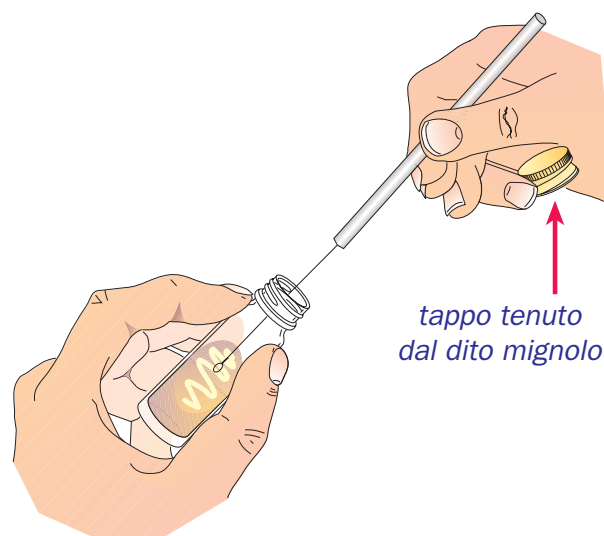
I terreni di coltura devono essere sterilizzati prima d'essere autoclavati. Bisogna usare contenitori sterili (beute, piastre Petri, ecc.) che bisogna mantenere chiusi con i rispettivi coperchi per evitare eventuali contaminazioni.

Il lavoro dovrebbe essere svolto vicino alla fiamma di un becco di Bunsen. Le correnti d'aria ascensionali causate dalla fiamma sono in grado di allontanare microbi che potrebbero contaminare i terreni di coltura e le colture pure.

Quando si devono eseguire trasferimenti di colture, i tappi e i coperchi non devono essere sollevati più del necessario. Dopo aver tolto un tappo dalla bottiglia, bisogna tenerlo in mano fino a quando non si deve richiudere la bottiglia. Ciò previene la contaminazione dei banchi di lavoro e delle colture. Dopo aver rimosso il tappo, bisogna passare alla fiamma il collo della bottiglia di coltura per 1-2 secondi. In questo modo si eliminano i microbi qui presenti e si

causano correnti convettive che possono aiutare a prevenire un'accidentale contaminazione della coltura da parte di microbi presenti nell'aria.

Con un po' di pratica, è possibile tenere la bottiglia in una mano e l'ansa da inoculo nell'altra in modo che il dito mignolo sia libero di tenere il tappo della bottiglia premendolo contro il palmo della mano. (In questo caso, è importante che il tappo della bottiglia sia appena avvitato per poter tenere in mano l'ansa da inoculo.) Se è necessario, due studenti possono lavorare insieme per svolgere questo procedimento.



Le anse da inoculo devono essere scaldate sino a divenire incandescenti per l'intera lunghezza dell'astina metallica. Questo deve essere fatto sia prima che dopo aver svolto il trasferimento delle colture. Le anse devono essere passate lentamente sulla fiamma del becco di Bunsen per evitare schizzi e formazione di aerosol.

Quando non si usa il Bunsen si deve lasciare la fiamma gialla, in modo da poterla individuare facilmente. La fiamma blu alta circa 5 cm può essere utilizzata per sterilizzare anse, fili metallici e fiammeggiare il collo delle bottiglie.

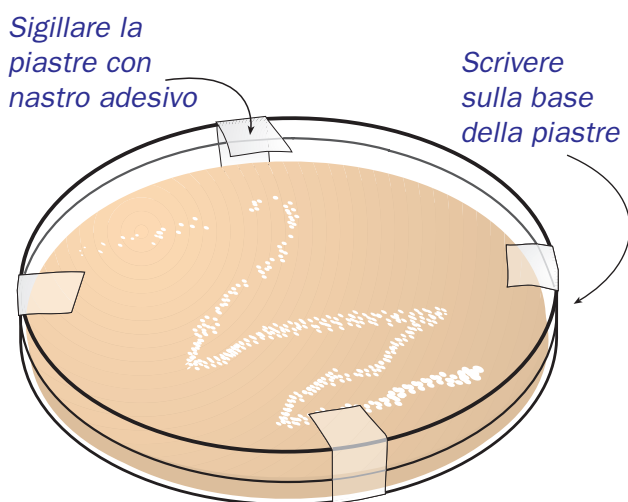
Evitare la contaminazione dell'area di lavoro. Gli strumenti devono essere sterilizzati immediatamente dopo l'uso e le pipette utilizzate devono essere subito poste in un beaker contenente una soluzione disinfettante preparata al momento dell'uso.

Incubazione delle colture



Scrivere le annotazioni sulla base della piastra Petri, prima dell'inoculo. Indicare il nome dell'operatore, la data, il nome e l'origine degli organismi, in modo da poter riconoscere la piastra e sapere ciò che contiene.

Dove occorre, sigillare con del nastro adesivo le piastre Petri, come mostra il disegno.



Questa chiusura assicura che le piastre non vengano accidentalmente aperte o confuse con altre. Nota: non bisogna sigillare le piastre lungo tutto il bordo, perché ciò causerebbe nella piastra condizioni di crescita anaerobica.

Batteri

Le colture batteriche, poste nelle piastre Petri, devono essere incubate capovolte, in modo che la condensa formatasi cada nel coperchio e non sulla colonia. (Se è presente condensa nella piastra Petri prima dell'inoculo, bisogna asciugarla prima di farne uso.)

Dopo 2-3 giorni di incubazione a 25-30 °C si può osservare la formazione di colonie.

Funghi

Le piastre Petri contenenti funghi non devono essere capovolte. Le colture di funghi devono essere così incubate per 7 giorni. La temperatura ambiente (circa 21 °C) è sufficiente per permettere la loro crescita, sebbene l'uso di un incubatore garantirebbe un maggior controllo.

Riordino e sterilizzazione



È molto importante sistemare in modo corretto tutto il materiale che è stato utilizzato in un lavoro pratico, per evitare una contaminazione del laboratorio e delle persone. Tutti i contenitori utilizzati per la conservazione e la crescita delle colture devono essere autoclavati, quindi lavati con soluzione disinfettante ed asciugati, prima d'essere riutilizzati.

In laboratorio dovrebbero esserci due autoclavi: una per la vetreria da riutilizzare e un'altra per il materiale da eliminare. Vicino ad ogni area di lavoro dovrebbero esserci un grosso e un piccolo contenitore per i rifiuti, quali pipette e vetrini da microscopio. Deve essere disponibile un contenitore metallico per eliminare la vetreria rotta.

Le pipette di plastica da gettare, vetrini da microscopio e ogni liquido derivante dalle colture devono essere prima lasciati in un recipiente con del disinfettante. Le pipette di plastica vengono poi autoclavate e quindi gettate, i vetrini da

microscopio devono essere immersi nel disinfettante per 24 ore, lavati ed asciugati prima di essere riutilizzati.

Le pipette di vetro devono essere gettate in un largo recipiente. Non bisogna togliere la pompetta dall'estremità terminale della pipetta fino a che l'estremità non è immersa nel disinfettante, diversamente potrebbe formarsi dell'aerosol. Le pipette usate devono essere autoclavate, lavate ed asciugate prima d'essere riutilizzate.

La vetreria contaminata (comprese le piastre Petri di vetro) deve essere gettata in un contenitore apposito da autoclave.

La vetreria che non è stata contaminata può essere sciacquata normalmente. I frammenti di vetro devono essere gettati in un recipiente per rifiuti destinato esclusivamente a questo uso. Se la vetreria è stata contaminata deve essere autoclavata prima di essere riposta. La vetreria non contaminata può essere riposta subito.

Sterilizzazione con l'autoclave



Lo scopo della sterilizzazione è **distruggere completamente tutti i microrganismi, comprese le loro spore.**

Tutte le attrezzature devono essere sterilizzate prima di iniziare il lavoro pratico in modo che non ci siano contaminanti. Le colture e i materiali contaminati devono essere sterilizzati anche dopo l'uso per non lasciare un rifiuto pericoloso.

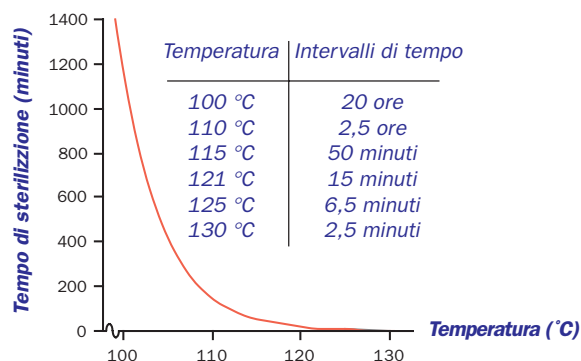
Autoclavare è il metodo preferito di sterilizzazione per i terreni di coltura, soluzioni acquose e colture di rifiuto. Il processo usa vapore ad alta pressione, di solito a 121°C. I microbi si eliminano meglio con il caldo umido che con il caldo secco, perché il vapore denatura le loro proteine. La sterilizzazione con l'autoclave può essere eseguita con una pentola a pressione d'uso domestico o con un'autoclave specifica per questo lavoro. La pentola a pressione d'uso domestico può essere usata nei laboratori di scuola, ma la piccola capacità può essere uno svantaggio quando ci si deve occupare di molto materiale.

Principi della sterilizzazione con l'autoclave

Sono due i fattori critici per la riuscita del processo. Il primo è che tutta l'aria deve essere rimossa dall'autoclave. Ciò assicura che il vapore ad alta temperatura venga a contatto con la superficie di ciò che deve essere sterilizzato. Se è presente dell'aria con la stessa pressione di vapore, la temperatura resta più bassa. Affinché i materiali vengano sterilizzati bisogna che non siano sigillati, in modo che l'aria che contengono possa uscire. Tappi e coperchi devono essere solo appena avvitati per permettere all'aria di uscire e per evitare pericolose variazioni di pressione al loro interno.

Il secondo fattore critico è il tempo che deve essere sufficiente per permettere al vapore di

penetrare (per conduzione) al centro dei terreni posti nelle piastre Petri o in altri contenitori. A seconda delle temperature terreni o attrezzature devono essere autoclavati per intervalli di tempo differenti, come mostra il grafico:



Notare che piccole variazioni di temperatura possono influire notevolmente sugli intervalli di tempo richiesti per la sterilizzazione. E' anche importante il fatto che queste temperature siano raggiunte da tutti i materiali che devono essere sterilizzati per il tempo specifico es. il brodo di coltura all'interno di un contenitore di fermentazione.

Quindi sulla durata del processo di sterilizzazione con autoclave influiscono tre fattori:

- **il tempo di penetrazione:** il tempo necessario affinché le parti più interne degli oggetti contenuti nell'autoclave raggiungano la temperatura richiesta.
- **il tempo di mantenimento:** il tempo minimo per cui, ad una determinata temperatura, tutti gli organismi presenti vengono eliminati
- **il tempo di sicurezza:** un margine di sicurezza; di solito metà del tempo di mantenimento.

La pentola a pressione d'uso domestico lavora ad una temperatura di 121°C. Così il tempo

medio per una tipica totale sterilizzazione è: tempo di penetrazione, 5 minuti; più 15 minuti di tempo di mantenimento; più un margine di sicurezza di circa 5 minuti, per un totale di 25 minuti.

Vetreria	Volume	Tempo di mantenimento
Tubo di test	20 ml	12-14 minuti
Beuta	50 ml	12-14 minuti
Beuta	200 ml	12-15 minuti
Contenitore di fermentazione	1 litro	20-25 minuti

Caramellizzazione

Le autoclavi apposite talvolta lavorano a 121 °C, sebbene i tempi ridotti possano sembrare preferibili, bisogna ricordare che le alte temperature sono dannose per alcuni terreni. La soluzione di glucosio, per esempio, alle alte temperature si caramellizza, producendo dei composti che sono tossici ai microbi. Nel caso del glucosio, questa reazione si può evitare aggiustando il pH del terreno a 4. Dopo la sterilizzazione il pH può essere riaggiustato se necessario.

Reazioni Maillard

Una reazione che altera un terreno di coltura modificando il colore a marrone bruno (la reazione Maillard) può anche essere causata dall'interazione di composti di azoto e carboidrati presenti nel terreno portato ad alte temperature. Ciò indica che si sono formati dei composti tossici per i microorganismi, perciò in alcune circostanze può essere necessario autoclavare prima i carboidrati e poi, separatamente, il restante terreno di coltura; es. nella preparazione dell'agar al latte.

Uso e manutenzione di routine delle autoclavi

Occorre sempre seguire le istruzioni d'uso quando si lavora con la pentola a pressione o una autoclave. Bisogna prestare particolare attenzione nell'assicurarsi che vi sia acqua sufficiente nell'autoclave in modo che non si scaldi a secco durante il processo. Una pentola a pressione d'uso domestico richiede almeno 250 ml d'acqua - autoclavi più capaci possono richiedere un volume maggiore. In autoclave l'uso di acqua distillata o deionizzata può prevenire la formazione di incrostazioni

calcareae. Le autoclavi devono essere asciugate prima d'essere riposte. Se ciò non viene fatto può rovinarsi la base dell'autoclave, si indebolisce seriamente il recipiente e ne consegue la deformazione verso l'esterno quando viene sottoposto a pressione.

Quando l'autoclave viene utilizzata, prima di stringere la valvola esterna, il vapore viene fatto uscire libero dall'autoclave per un minuto, per far fuoriuscire insieme tutta l'aria che è contenuta all'interno. Quando si è completato il ciclo di sterilizzazione con autoclave, per un tempo opportuno bisogna lasciare raffreddare il contenuto e tornare alla normale pressione atmosferica. Il recipiente o le valvole non devono essere aperte quando sono sotto pressione perché ci si può scottare. L'apertura anticipata del coperchio e una conseguente riduzione di pressione può causare l'ebollizione improvvisa dei liquidi all'interno dell'autoclave. L'agar o il brodo di coltura può quindi schiumare e ribollire fuori dai contenitori.

Sterilizzazione chimica

Per sterilizzare vengono utilizzati svariati composti chimici. I più comuni disinfettanti usati in laboratorio sono i detergenti fenolici e ipocloriti.

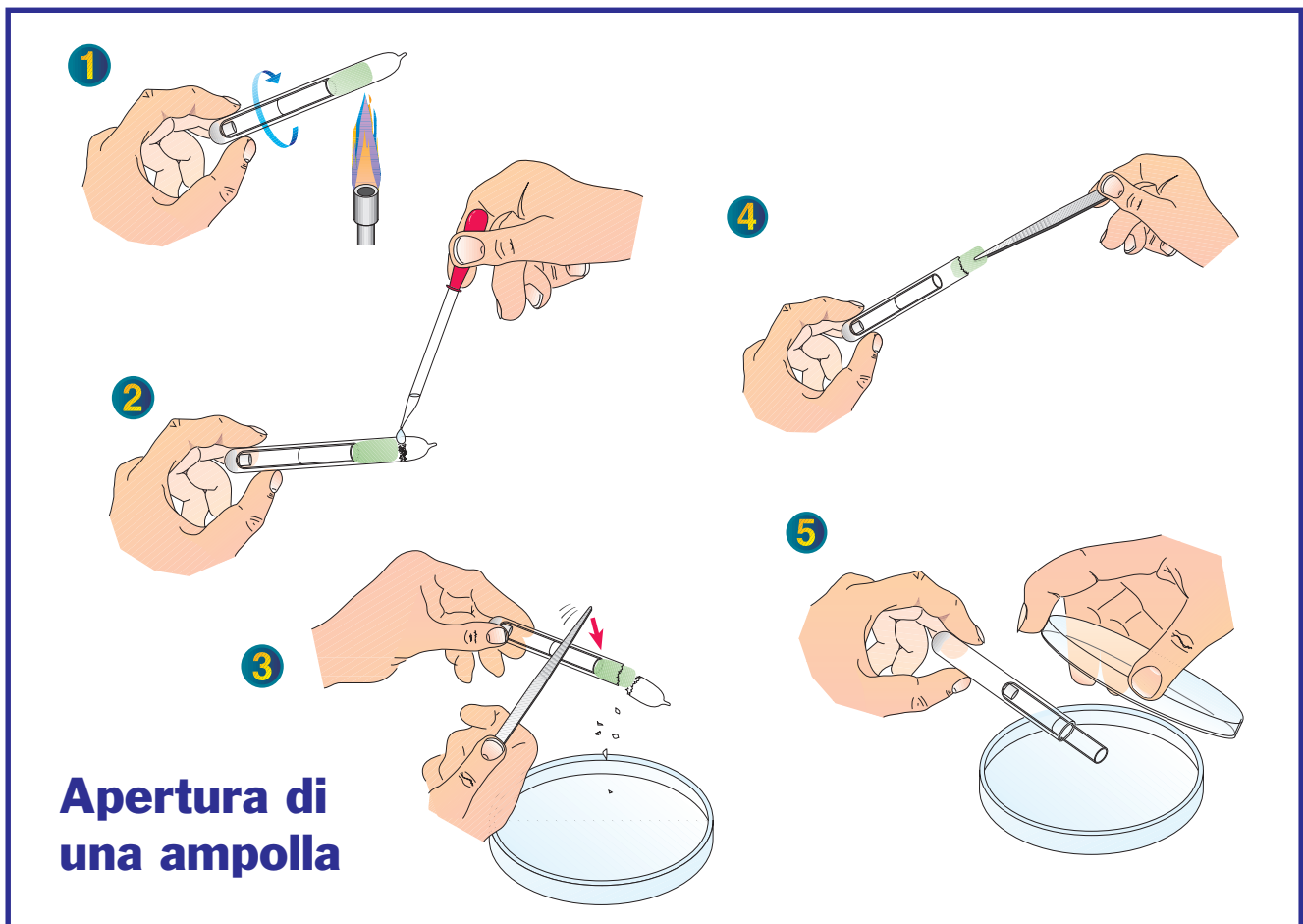
I detergenti fenolici sono efficaci contro batteri e funghi, ma innocui contro spore ed ogni tipo di virus. Essi sono resi inefficaci da un prolungato contatto con gomma, legno e plastica. In laboratorio si usano per recipienti di rifiuti e per disinfettare le superfici.

Gli ipocloriti (come la candeggina) non sono idonei per la sterilizzazione di piastre Petri usate ecc., in quanto possono essere da proteine e da materiale plastico. Tuttavia una soluzione al 5% di Domestos (Lever) o soluzione Clorato I sono adatte per disinfettare i recipienti di rifiuto.



ATTENZIONE!
Occorre usare occhiali di sicurezza, in quanto possono saltare (agli occhi) frammenti di vetro.

1. Scaldare l'estremità appuntita dell'ampolla sulla fiamma di un Bunsen. Ruotare l'ampolla per scaldarla (vd. figura).
2. Con una pipetta, bagnare, versando al massimo due o tre gocce d'acqua fredda, l'estremità appuntita dell'ampolla. Il vetro si dovrebbe incrinare.
3. Con decisione togliere, facendo però attenzione, la punta di vetro incrinato dell'ampolla servendosi di un paio di pinzette, facendo cadere i frammenti di vetro all'interno di una piastra Petri. Assicurarsi che non restino nell'ampolla frammenti di vetro.
4. Con un paio di pinzette, rimuovere il tappo in lana di vetro che teneva fermo il cilindretto di vetro all'interno dell'ampolla.
5. Aprire una piastra Petri sterile inclinando un poco il coperchio e porre il cilindretto all'interno, fatto ciò riporre il coperchio sulla piastra.



Ricostituzione delle colture disidratate e congelate

1. Con le pinzette, rimuovere il tappo di ovatta e passare velocemente sulla fiamma l'apertura del tubetto di vetro posto all'interno.
2. Asetticamente aggiungere 1 ml di brodo nutriente sterile al contenuto del tubetto interno.
3. Ripassare alla fiamma l'apertura del tubetto e rimettere il tappo di ovatta. Aspettare 20 minuti per permette alla coltura di idratarsi e riattivarsi.
4. Usare un'ansa da inoculo passata sulla fiamma per amalgamare bene i contenuti dei tubetti e metterli nel tubetto di test contenente circa 5 ml di brodo nutriente.
5. Incubare la coltura a 30 °C una notte.

Il giorno seguente...

6. Usare l'ansa da inoculo passata prima sulla fiamma per stendere una goccia della sospensione preparata sulla superficie della placca d'agar nutriente. *Questo lavoro deve essere fatto per evitare che la coltura venga contaminata - sulla piastra deve crescere solo un tipo di colonia.*