

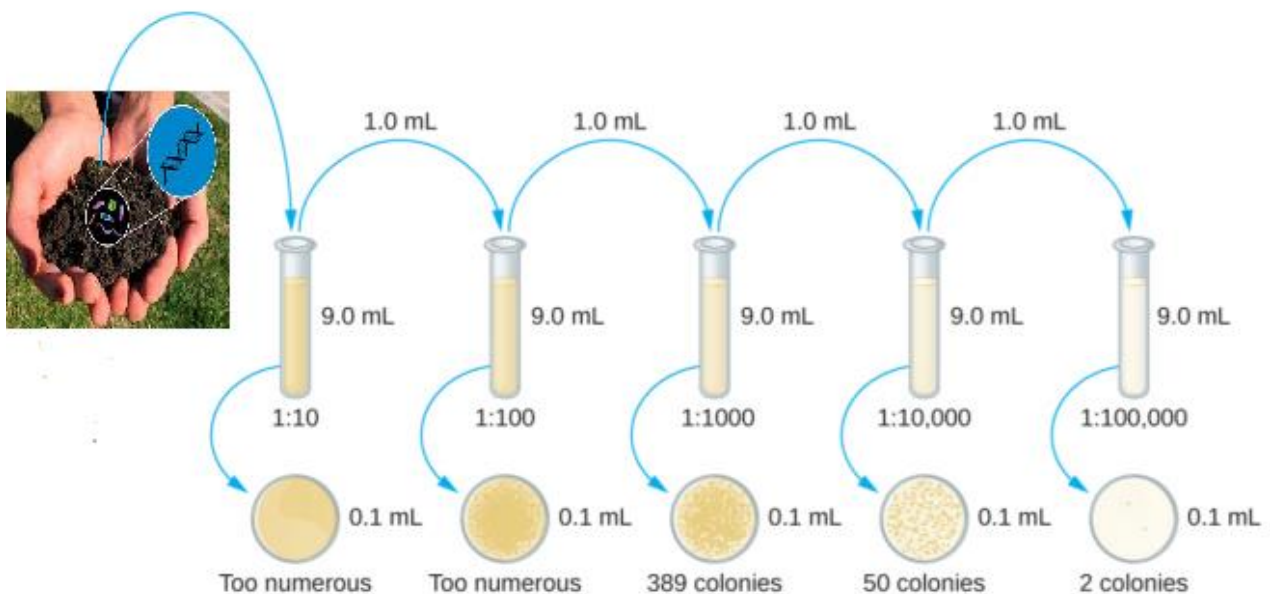
Esercizi proposti

1. Valutazione della composizione microbica presente in un campione naturale. I singoli cloni isolati possono essere utilizzati per ottenere colture pure.

Tale valutazione verrà effettuata tramite la tecnica della conta vitale in piastra per diluizioni decimali, ed avrà un aspetto quantitativo e qualitativo.

Il numero di colonie che si svilupperanno su ogni piastra sarà funzione della carica microbica presente nel campione di partenza e della diluizione effettuata. Moltiplicando il numero di colonie contate sulla piastra per il fattore di diluizione si potrà risalire al numero di cellule presenti nel campione di partenza, e in grado di crescere nelle condizioni fornite, per unità di volume.

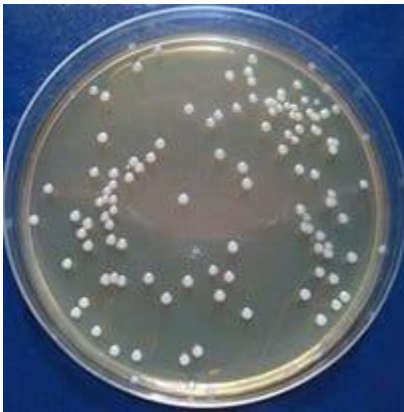
La determinazione della carica microbica per unità di volume fornisce un dato quantitativo, mentre la determinazione della morfologia di singole colonie (che è indicativa della specie di microrganismo isolato) rappresenta l'aspetto qualitativo dell'analisi.



Il campione di partenza pari ad 1g è stato diluito di 10 volte in acqua sterile da cui poi è stato prelevato 1 ml di sospensione da trasferire nella prima provetta (diluizione 1:10). Le diluizioni successive verranno effettuate prelevando 1 ml dalla provetta "1:10" e trasferendolo nella successiva provetta, e così via. 0,1 ml di ogni diluizione verranno piastrati su una piastra di Nutrient Agar (per batteri). Con una spatola sterile spandere il campione sulla piastra finché il liquido è perfettamente assorbito. Incubare le piastre capovolte in termostato a 30 °C per almeno 48 ore.

Esercizio 1: Contare le colonie ottenute seminando le diluizioni e calcolare le CFU/ml (Colony Forming Units) della sospensione iniziale. Per il calcolo è necessario contare il numero di colonie per ogni piastra e moltiplicare per la diluizione corrispondente considerando anche il volume piastrato (0,1 ml).

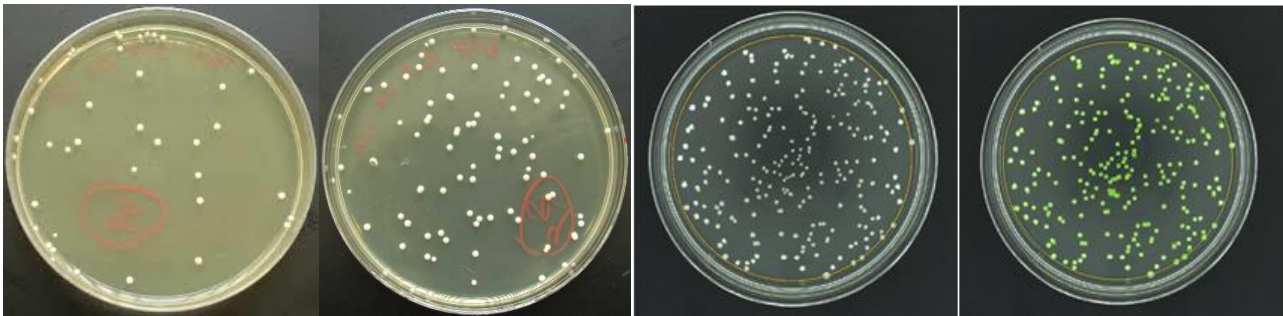
Esempio



Contare le colonie, moltiplicare il risultato per 10 (abbiamo seminato 0,1 ml!) e per il fattore di diluizione corrispondente. Esempio immaginiamo di aver seminato 0,1 ml (100µl) della diluizione 10^{-2} volte e aver contato 102 colonie.

CFU/ml = numero colonie * fattore di diluizione

$$\text{CFU/ml} = 102 * 10^4 = 1,02 * 10^5$$



Piastra 1

Piastra 2

Piastra 3

Piastra 4

Diluizione 1:1000

Diluizione 1:100

Diluizione 1:1000

Diluizione 1: 100

Terreno: MA

Terreno: NA

Terreno: NA

Terreno: MA

results:

$4,1 * 10^5$

$9 * 10^4$

$2 * 10^6$

$2,1 * 10^5$

Esercizio 2:.

Di seguito sono mostrati i risultati del piastramento a 25-30-37 °C di campioni prelevati in diversi habitat naturali. Per ogni diluizione i numeri sono riferiti rispettivamente alle tre temperature testate.

Calcolare il numero di UFC /ml per ogni campione, considerando criticamente i dati grezzi e identificando la diluizione corretta per eseguire il conto. Sottolineare eventuali casi di incongruenza tra le diluizioni. Quali sono gli effetti dell'incubazione del medesimo campione alle diverse temperature?

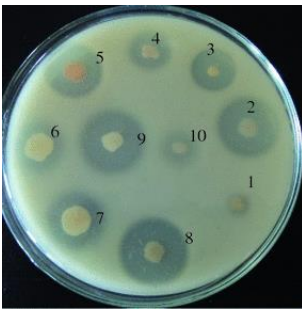
gruppo	campione	temperatura (°C)	Nutrient Agar			
			1:10	1:100	1:1000	1:10.000
1	bosco	25-30-37	4356-7677-12231	439-782-1989	39-70-243	4-9-28
2	orto	25-30-37	889-1231-1342	89-145-152	8-12-17	0-1-4
3	frutteto	25-30-37	1110-2234-3750	174-253-400	25-29-39	0-3-7
4	stagno	25-30-37	210-223-301	23-21-32	2-1-3	0-0-0
5	scarico	25-30-37	532-623-645	48-65-71	3-5-10	0-0-0
6	bosco	25-30-37	5653-8749-14004	543-909-1789	62-85-191	7-12-24
7	orto	25-30-37	645-980-1200	67-68-123	8-11-10	1-1-2
8	frutteto	25-30-37	1540-2430-4204	134-300-543	17-31-45	0-5-9
9	stagno	25-30-37	123-213-323	12-25-34	1-3-4	0-0-0
10	scarico	25-30-37	432-600-624	45-63-73	5-5-7	0-0-0

2. Identificazione microorganismo produttore di amilasi

Lo scopo di questa analisi è la ricerca di un produttore di amilasi tra i microrganismi isolati dal proprio campione.

A questo proposito vengono depositati 5ul di sospensione di ciascuna colonia su una piastra di YPS (piastra con amido). La piastra verrà incubata per qualche giorno a 30°C.

Un microorganismo scelto tra quelli positivi all'attività amilolitica verrà inoculato in apposite beute al fine di meglio caratterizzarne le capacità produttive.



La Colonia numero 8 viene scelta per la definizione e la grandezza dell'alone di degradazione.

Allestimento saggio produttivo per attività amilasica.

Una volta identificato un microorganismo produttore, è necessario mettere a punto tutte le condizioni culturali più idonee a ottenere la massimizzazione del prodotto di interesse. Si tratta di un processo iterativo che prende in considerazione una serie di parametri quali temperatura, pH composizione del terreno e tempistiche della crescita. Tale processo sarà simulato seguendo l'accumulo nel tempo di amilasi da parte dei microrganismi isolati.

La produzione di amilasi avviene in una fase tardiva della crescita, in quanto i microrganismi attivano la sintesi di questo tipo di enzimi in risposta a stimoli esterni di carenza di nutriente. I tempi di produzione sono quindi abbastanza lunghi e distinti dalla fase di crescita.

Inoculare una beuta contenente alcuni possibili terreni allo scopo di identificare il miglior terreno produttivo con una ansata di cellule, oppure un volume definito (es. 300 ul) della sospensione del microorganismo produttore. Incubare a diverse T°: 25°, 30°, 37° C, in agitazione. Ogni 24 ore fino al terzo giorno viene prelevata per centrifugazione un'aliquota di surnatante.

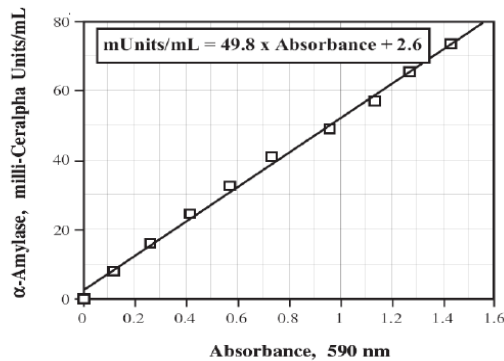
Terreni testati

TSB (tryptic Soy Broth) : è un terreno di arricchimento liquido universale. I suoi costituenti sono essenzialmente una miscela di aminoacidi ottenuti dalla degradazione delle proteine della soia (e della caseina), addizionati di Sali inorganici e 2,5 g/l di glucosio. Il glucosio viene preferenzialmente usato durante la fase di crescita esponenziale delle cellule.

TSB + GLUCOSIO 0.2%: si tratta di un terreno TBS ulteriormente arricchito con glucosio. Le cellule hanno a disposizione del glucosio anche durante la fase stazionaria.

YPD 0.5x (Yeast Extract, Peptone, Dextrose). Terreno che contiene una miscela di aminoacidi e vitamine, e glucosio in gran quantità. La crescita delle cellule è molto sostenuta.

Proponiamo di calcolare le concentrazioni di amilasi raggiunte dalle stesse cellule nei tre terreni e a tre diverse temperature. Sono proposti i numeri relativi alle produzioni significative. La diluizione proposta porta a uno sviluppo di colorazione compreso nei limiti della retta di taratura.



Units/mL = milliUnits/assay x 1/1000 x Dilution
 where:
 1/1000 = conversion from milliUnits to Units
 Dilution = further dilution of the initial solution (culture supernatant)

Esercizio 4: completare la tabella con le attività amilasiche e rispondere alla domanda

Tabella diluizioni

Colonna1	Colonna2	Colonna3	Colonna4	Colonna5
terreni	tempo (h)	25°C	30°C	37°C
TBS	0			
	12		20	50
	24	50	100	100
	72	100	200	200
	96	100	200	200
TBS + glucosio	0			
	12			
	24			100
	72	200	200	200
	96	200	200	200
YPD 0,5X	0			
	12			
	24			
	72	20	200	200
	96	20	200	200

Tabella Abs 590 nm

Colonna1	Colonna2	Colonna3	Colonna4	Colonna5
terreni	tempo (h)	25°C	30°C	37°C
TBS	0			
	12		0,35	0,47
	24	0,39	0,35	0,55
	72	0,55	0,43	0,86
	96	0,59	0,37	0,91
TBS + glucosio	0			
	12			
	24			0,41
	72	0,11	0,11	0,81
	96	0,14	0,22	0,73
YPD 0,5X	0			
	12			
	24			
	72	0,47	0,09	0,26
	96	0,56	0,18	0,31

Completare la tabella sottostante con le attività amilasiche in mU/mL applicando la seguente formula: **Attività amilasiche in milliUnità (mU/ml) = (49,8 * Abs + 2,6) * diluizione.**

Colonna1	Colonna2	Colonna3	Colonna4	Colonna5
terreni	tempo (h)	25°C	30°C	37°C
TBS	0			
	12			
	24			
	72			
	96			
TBS + glucosio	0			
	12			
	24			
	72			
	96			
YPD 0,5X	0			
	12			
	24			
	72			
	96			

In quale condizione la produzione di amilasi risulta più elevata?

3. Crescita in bioreattore

Lo scopo di questa sperimentazione riguarda la coltivazione in bioreattore di un ceppo microbico, in grado di produrre un enzima amilolitico (alfa-amilasi).

In generale, quando si vuole sviluppare un processo di produzione per via microbica di una molecola di interesse industriale, si deve considerare il passaggio di scala: dalla beuta al bioreattore.

I volumi in gioco in un processo produttivo e la necessità di misurare e controllare i parametri di processo, fanno sì che sia impensabile lavorare in beuta. Sarà infatti indispensabile scalare progressivamente i volumi di coltura a quelli della fase produttiva (ad es. da poche centinaia di ml della beuta a parecchi metri cubi dei bioreattori produttivi). Sarà inoltre necessario avere un costante controllo del processo di coltivazione e produzione.

Nel bioreattore è possibile misurare in modo continuo e quindi modulare alcuni parametri chimico-fisici del processo, quali: temperatura, pH, agitazione, quantità di ossigeno disciolto nel medium, potenziale red-ox del mezzo, livello di nutrienti e metaboliti secondari presenti nel brodo di coltura.

L'attività di ricerca e sviluppo di un processo microbiologico prevede quindi:

- La definizione, in beuta, della composizione dei terreni potenzialmente più idonei alla crescita del microorganismo ed alla produzione della molecola di interesse. Si definiranno i componenti da introdurre, in che proporzione ed il grado di purezza delle materie prime.

- la messa a punto, in bioreattore, della tecnica di coltivazione più appropriata (ad es. batch o fed-batch) e delle condizioni chimico-fisiche ottimali per il processo. Queste ultime potrebbero variare durante la coltivazione, poiché in alcuni casi, la fase di crescita risulta nettamente distinta da quella produttiva. Soltanto in bioreattore tali parametri potranno essere accuratamente modulati.

Nella maggior parte dei casi, l'ottimizzazione del processo in bioreattore porta ad una riduzione dei tempi di coltivazione e, soprattutto, ad un incremento della resa di produzione anche di 10-100 volte rispetto a ciò che si ottiene in beuta.

Concentration Time Profiles

