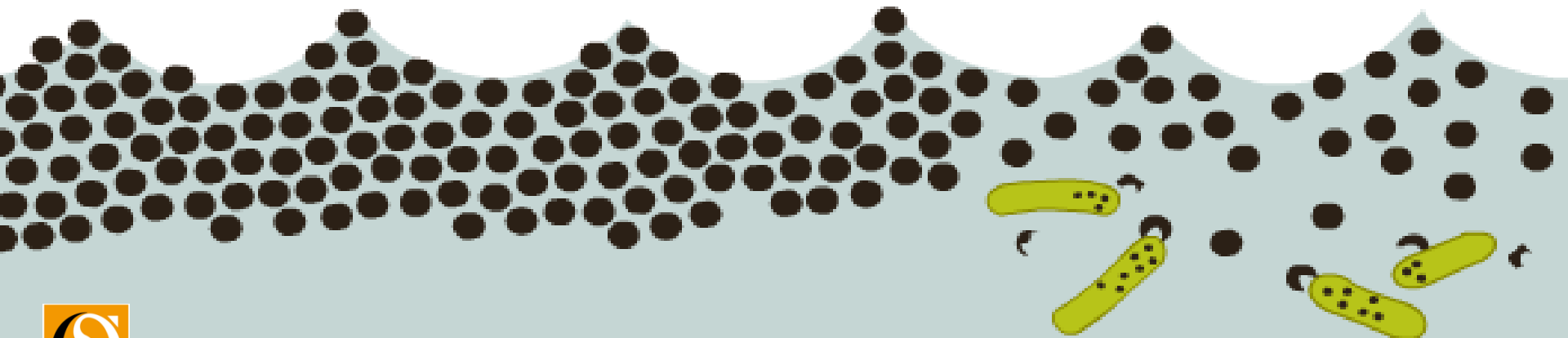




BIOREMEDIATION

PROCEDURA DI LABORATORIO

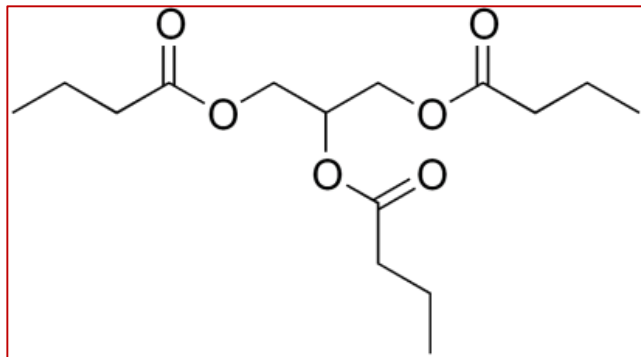


1° GIORNO



Piastre con terreno selettivo
per batteri con lipasi

10 g/L tributirina
15 g/L agar



Sterilizzare in autoclave e colare su piastre petri

Piastre senza terreno selettivo

5 g/L LB
15 g/L agar



1° GIORNO



Preparazione terreno di crescita liquido (LB)

5 g/L peptone
3 g/L estratto lieviti

(Il pH risulta circa 7)

Sterilizzare in autoclave.



Preparazione terreno per estrarre batteri

10 g terra + 100 mL 0,9% NaCl
Mescolare bene, e mettere per 24 ore
a T ambiente sotto blanda agitazione
(120 rpm)

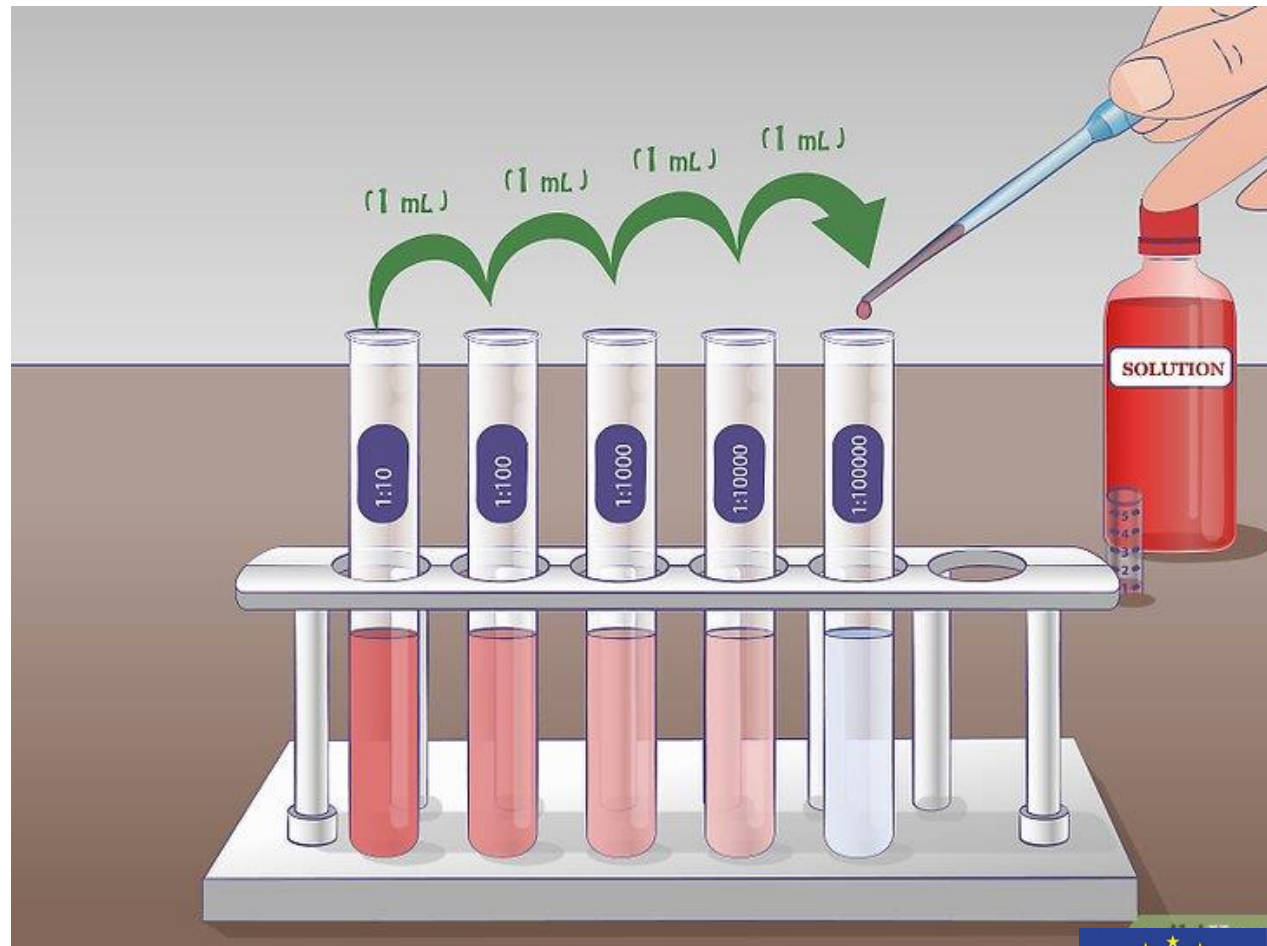


2° GIORNO



Effettuare diluizioni seriali dei batteri in 0.9% NaCl:

1:10
1:100
1:1.000
1:10.000
1:100.000



2° GIORNO



Piastrare le diluizioni 1:10 1:1.000 e 1:100.000 sulle piastre petri, 100 uL per piastra



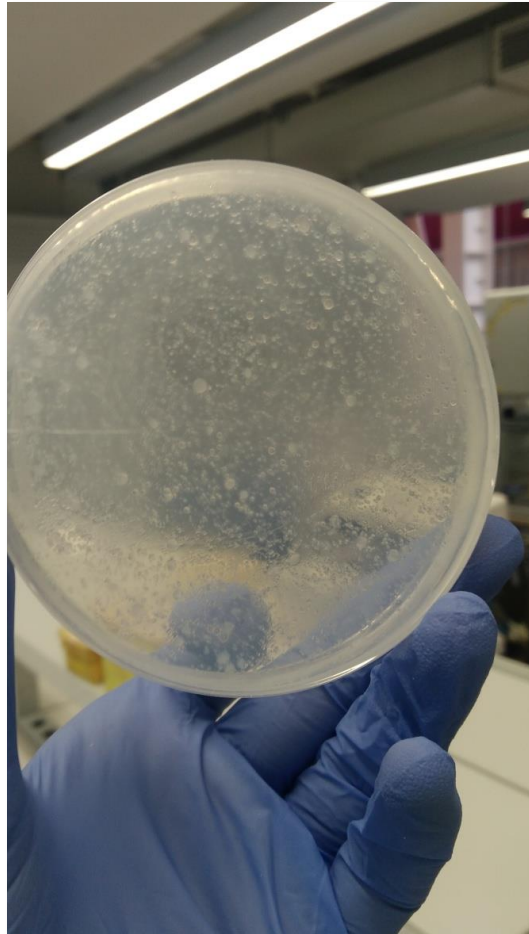
Aspettare 10 minuti per l'assorbimento nel terreno, quindi lasciare 24 ore a T ambiente



3° GIORNO



Raccogliere le colonie con ansa sterile e trasferirle in 200 mL di terreno di crescita liquido a 37°C per 24 ore sotto agitazione.



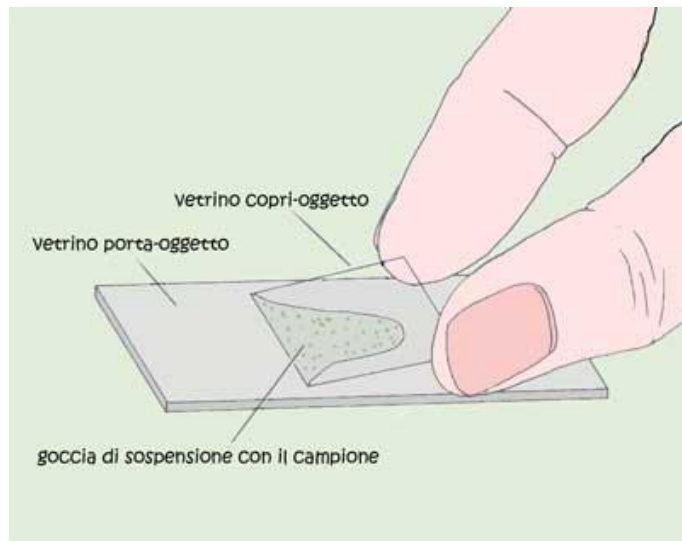
3° GIORNO



Osservazione dei batteri delle piastre con LB e con tributirina al microscopio ottico:

Con un'ansa sterile, strisciare una colonia prelevata dalla piastra su un vetrino, aggiungere una goccia di safranina o blu di toluidina, attendere 5 minuti, risciacquare delicatamente con acqua distillata e coprire con vetrino coprioggetto.

Osservare le differenze tra i batteri dei due tipi di piastre al microscopio ottico a 400 ingrandimenti.



4° GIORNO



Centrifugare il terreno liquido di crescita dei batteri in provette da 50 mL a 4000 rpm per 10 minuti, scartare il surnatante, risospendere in minima quantità di NaCl 0,9%



Beuta	NaCl 0,9%	NaCl 5%	Tetrazolio 0,2%	Olio	Batteri	HCl 5N	T(°C) 24h
A	25 mL	-	0,5 mL	2 mL	-	-	37°C
B	25 mL	-	0,5 mL	2 mL	1 mL	-	37°C
C	25 mL	-	0,5 mL	2 mL	1 mL	1 mL	37°C
D	25 mL	-	0,5 mL	2 mL	1 mL	-	70°C
E	-	25 mL	0,5 mL	2 mL	1 mL	-	37°C



4° GIORNO



Provetta	NaCl 0,9%	Batteri	Olio	T(°C) 24h
A	2 mL	-	1 mL	37°C
B	-	2 mL	1 mL	37°C
C	-	2 mL	1 mL	37°C

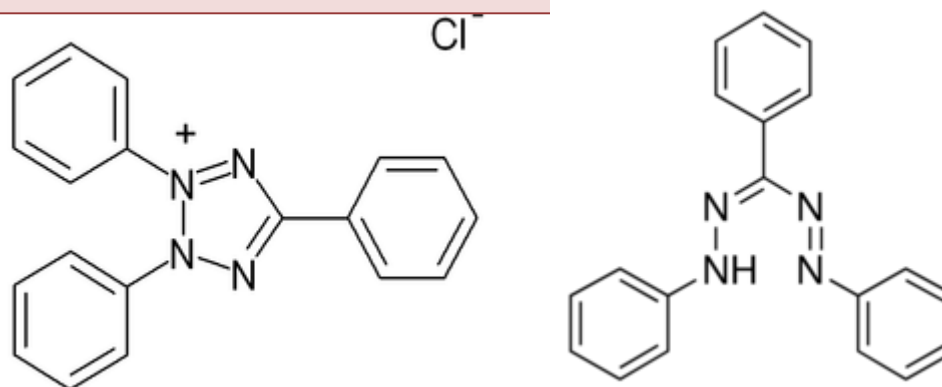
Misurare altezza delle due fasi. Vortex per 1 minuto e lasciare 24 ore a 37°C.



5° GIORNO



Osservarne le variazioni che dimostrano la crescita batterica (il trifeniltetrazolio, incolore, viene convertito in trifenilformazano, di colore **rosso**, ad opera di donatori elettronici mitocondriali dei batteri come succinato deidrogenasi).



Trifeniltetrazolio cloruro e trifenilformazano



Misurare altezza delle due fasi (V relativi). Osservarne le variazioni, che dimostrano la formazione di emulsionanti ad opera dei batteri.



5° GIORNO

