

Chimica Organica

Relazione

Titolo

Semina per spatolamento

Obiettivo

Eseguire una semina per spatolamento di un campione per l'ottenimento di colonie pure

Prerequisiti

Tecniche di laboratorio microbiologico

Reagenti, Materiali, Attrezzature

Strumenti di misura:	<ul style="list-style-type: none"> Pipette sterili da 1ml (graduazione 100μL)
Vetreteria:	<ul style="list-style-type: none"> Piastre petri sterili monouso Provette
Materiale di consumo:	<ul style="list-style-type: none"> Terreno di coltura VRBA liquido agarizzato Soluzione isotonica sterile Campione contenente Enterococchi
Altro:	<ul style="list-style-type: none"> Spatola sterile Bunsen

Procedimento

Si preleva un millilitro di campione e lo si porta in una provetta contenente 9ml di soluzione sterile isotonica, in questo modo si ottiene la prima diluizione decimale. Proseguire questo metodo fino ad arrivare ad una diluizione di 10^{-6} volte, avendo cura di miscelare bene il contenuto della provetta dopo ogni passaggio. Facendo questa operazione è necessario cambiare pipetta ad ogni diluizione per evitare di interferire con l'effettiva concentrazione delle diluizioni.

Si scalda ora il terreno agarizzato in forno a microonde fino alla sua liquefazione: l'operazione di riscaldamento in microonde permette anche di ottenere la sterilità del terreno; una volta che il terreno è liquido è possibile piastrarlo nelle piastre petri sterili monouso precedentemente siglate. Questa operazione va effettuata in sterilità, restando nelle vicinanze di un becco bunsen acceso o sotto una cappa a flusso laminare.

Quando il terreno si è raffreddato solidifica: ora si prelevano 100 μ L di ogni diluizione e si versano nella relativa piastra precedentemente siglata: con spatola sterile facendo un movimento circolare disperdiamo il campione su tutta la superficie del terreno solido fino all'asciugatura superficiale. Queste ultime due operazioni si possono effettuare in serie a patto che si parta dalla soluzione più diluita procedendo verso quella più concentrata.

Si incubano ora le piastre raggruppate e capovolte in incubatrice per 24h a 44°C.

Terminata la crescita si procede alla conta.

Dati Sperimentali

Diluizione	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
n° colonie	> 300	78	4	0
UFC/ml	-	$7,8 \cdot 10^5$	-	-

Osservazioni

- Piastrando 100 μ L di campione si ottiene un'ulteriore diluizione decimale quindi la piastra associata alla diluizione 10⁻³ in realtà sarà la diluizione 10⁻⁴;
- L'unica piastra accettabile è quella con la diluizione 10⁻⁵ che presenta crescita batterica tra 20 e 200 colonie.

Conclusioni

La concentrazione di enterococchi nel campione iniziale è di $7,8 \cdot 10^6$ UFC/ml.